MEMÓRIAS

DO

INSTITUTO BUTANTAN

1959

TOMO XXIX

★

São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65

PROFESSOR JOSÉ MANOEL RUIZ

* 5.II.1913 + 28.V.1959

Ainda uma vez visitou a morte, da mais inesperada forma, êste Instituto, levando um dos que se dedicavam a erigir o seu mais precioso edifício: — o patrimônio científico.

Ruiz, como era conhecido o Professor José Manoel Ruiz, não existe mais. Morreu do coração quem viveu para o coração: altivo, mas afável, sociável.

Sua dedicação à Ciência obedeceu a chamado incoercível. Tomado o primeiro contacto com o Laboratório Clínico como Farmacêutico, a vocação não permitiu desvio do currículo: auxiliar de ensino, assistente, biologista pesquizador, livre docente, Professor Adjunto da Universidade de São Paulo.

Nomeado em regimem de tempo integral para êste último cargo, não poude permanecer no quadro oficial de técnicos do Instituto Butantan que, entretanto, fêz questão de conservá-lo como membro honorário do seu corpo de pesquizadores, entre os quais prosseguiu seus trabalhos.

Apesar de dedicado à Helmintologia também fazia incursões científicas em outros domínios, devendo-lhe o Butantan ótimo trabalho sôbre distinção genérica das serpentes da família *Crotalidae* pela osteologia craniana; em seus estudos sôbre Esquistossomose dedicou à anatomia e sistemática dos hospedeiros intermediários vários trabalhos, todos magnìficamente ilustrados com desenhos que executava com perfeição, elegância e rapidez dificilmente igualáveis. Esta

era uma das manifestações de sua mentalidade de esteta e de amante da natureza, das artes e da técnica. Modelador, fotógrafo, pintor, excursionista, caçador, agricultor, eis algumas das atividades em que aplicava o talento, no pouco tempo que podia distrair do ensino, da pesquisa e da dedicação à família, constituída por D. Mercedes Vieira Ruiz e seus filhos José Manoel e José Rubens.

Tão intensa foi sua atividade, tanto se agitou e produziu que, dêle, paradoxalmente, quase se poderá dizer: — morre moço, mas viveu um século...

Nascido em Nova Europa, Estado de São Paulo, a 5 de fevereiro de 1913, de progenitores originários da Hespanha, ingressou em 1936 na Faculdade de Odontologia e Farmácia da Universidade de São Paulo, concluindo o curso de Farmácia em 1938. Fêz os cursos secundário e superior a custa de sacrifício das horas de descanso, pois, para manter-se durante todo êsse tempo trabalhou nos mais diversos misteres, desde o de entregador até o de desenhista.

Nesse mesmo ano exerceu as funções de preparador da Cadeira de Zoologia e Parasitologia daquela Faculdade, pela qual foi contratado em 1939 para o cargo de Assistente da referida Cadeira, na qual deveria alcançar os cargos de Livre-docente, em 1948, de representante dos Livre-docentes junto à Congregação, em 1949, até atingir o título de Professor Adjunto, em 1955, posto em que veio a ser efetivado em regime de tempo integral e onde o colheu a morte.

Ao mesmo tempo que exercia a didática, iniciava sua carreira de pesquisador, despretenciosamente, como estagiário na Secção de Parasitologia do Instituto Butantan, em 1941, permanecendo nesse posto puramente honorífico até 1950, quando conquistou, pelo seu valor, o cargo de Biologista do mesmo Instituto, lugar que conservou até ser posto em regime de tempo integral como Professor Adjunto da Faculdade de Odontologia e Farmácia da Universidade de São Paulo.

Várias excursões científicas, algumas realizadas a própria custa, à região da Ilha do Bananal, no Rio Araguaia e a Minas Gerais, viagem à Guiana Francesa, ao nordeste brasileiro e ao Estado de Goiás e Triangulo Mineiro renderam-lhe material zoológico, parasitológico e etnográfico.

Algumas dessas viagens, bem como numerosas outras excursões a localidades mais próximas, foram realisadas com o intuito de aprofundar pesquisas sôbre um capítulo de Parasitologia que o apaixonou, a Esquistossomose, que a ele fica devendo o esclarecimento de vários aspectos importantes como se deduz da bibliografia desse incansável pesquisador.

No Instituto Butantan deixou numerosa coleção helmintológica cuidadosamente tratada, identificada e fichada, tendo sua Biblioteca especialisada sido doada pela viúva à Cadeira de Parasitologia da Faculdade onde era

Professor. Dos preparados da coleção helmintológica numerosos são tipos de novas espécies por êle descritas.

Acabara de realisar, em 1959, proveitosa viagem de dois meses à Venezuela, a convite da Universidade de Merida, na qual proferiu em língua castelhana, várias conferências, havendo, naquele país projeto de fazê-lo voltar para mais longa permanência, o qual não chegou a concretisar-se.

A meia centena de trabalhos que publicou, pràticamente todos resultantes de pesquisas originais levadas a efeito na Secção de Parasitologia do Instituto Butantan, espelharam o que foi a sua vida científica.

Em agradecimento pela valiosa contribuição que deu para o engrandecimento do nome dêste Instituto, sua Diretoria preparou e fêz publicar este ligeiro histórico da vida de um pesquisador que tanto teve de modesto quanto de honesto.

BIBLIOGRAFIA

1 — Trematoides de ofidios. *Liophistrema pulmonari*, n. gen., n. sp. *Liophistreminae*, n. subfam. *Westella sulina*, n. gen., n. sp. (*Plaorchiidae*).
Memórias do Instituto Butantan, 16: 157-167, 1942.
Em colaboração com P.T. Artigas e A.T. Leão.

2 — Notas Helmintológicas. 1 — Três novas espécies de *Opisthogonimus* parasitas de ofídios brasileiros. (*Trematoda*: *Plagiorchiidae*).
Memórias do Instituto Butantan, 16: 171-176, 1942.
Em colaboração com A. T. Leão.

3 — Notas Helmintológicas. 2 — Algumas considerações em tôrno do gênero *Leptophylus* Cohn, 1902 (*Trematoda*: *Plagiorchiidae*), pade ofídio brasileiro.
Memórias do Instituto Butantan, 16: 287-293, 1942.
Em colaboração com A.T. Leão.

4 — Notas Helmintológicas. 3 — Nova espécie de trematóide do gênero *Infidum* Travassos, 1916 (*Dicrocoeliidae*), parasita de ofídio brasileiro.
Memórias do Instituto Butantan, 16: 203-206, 1942.

5 — Notas Helmintológicas. 4 — *Choledocystus vesicalis*, sp. n., parasita da vesícula biliar de *Bufo marinus* (L.). (*Trematoda*: *Plagiorchiidae*).
Memórias do Instituto Butantan, 16: 209-212, 1942.
Em colaboração com A.T. Leão.

6 — Notas de divulgação científica. 1 — Protozoários intestinais do homem frequentes no Brasil.
Revista XXV de janeiro, 11: 22-27, 1943.

7 — Flageloses intestinais.
Revista XXV de Janeiro, 12: 30-35, 1943.
Em colaboração com E. Bandklajder.

8 — Notas de divulgação científica. 2 — Sôbre o "Water itch" ou "Swimmer's itch", um interessante caso de "parasitismo extraviado".
Revista XXV de Janeiro, 13: 28-30, 1943.

9 — Notas Helmintológicas. 5 — *Mesocoelium sibinomorphi*, sp. n. (*Trematoda*: *Dicrocoeliidae*).

Revista Brasileira de Biologia, 3 (2) 145-148, 1943.
Em colaboração com A.T. Leão.

10 — Notas Helmintológicas. 6 — *Cyatocotyle brasiliensis*, n. sp. (*Trematoda*: *Cyathocotylidae*), parasita de *Caiman sclerops* (Gray) do Brasil.

11 — *Catadiscus freitaslenti* n. sp., (*Trematoda*: *Paramphistomatidae*), parasita de ofídios neotrópicos; observação sôbre a presença de dois canais referentes no gênero *Catadiscus* Cohn, 1904.
Memórias do Instituto Butantan, 17:29-34, 1943.

12 — *Neoctangium Travassosi*, gen. n., sp. n., (*Trematoda*: *Paramphistomoidea*), parasita de quelônio marino. Chave dos gêneros da família *Microscaphidiidae* Travassos, 1922.
Memórias do Instituto Butantan, 17: 34-45, 1943.

13 — Algumas notas sôbre o gênero *Opisthogonimus* Luthe, 1909. Descrição de *Ophisthogonimus serpentia*, n. sp., trematoide de ofídios.
Memórias do Instituto Butantan, 17: 47-59, 1943.
Em colaboração com P.T. Artigas e A.T. Leão.

14 — Notas Helmintológicas. 7 — *Opisthogonimus Fariai* n. sp. (*Trematoda*: *Opisthogoniminae*).
Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia, U.S.P., 5: 96-104, 1943.
Em colaboração com A.T. Leão.

15 — Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematoides brasileiros.
Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia, U.S.P., 3: 105-119, 1943.

16 — Considerações sôbre a classificação das famílias *Pronocephalidae* Looss, 1902 e *Notocotylidae* Luehe, 1909.
Revista Brasileira de Biologia, 4 (2): 215-228, 1944.

17 — Processo para a obtenção das formas de vida livre de nematoides monoxenos de de penetração ativa.
Revista XXV de Janeiro, 25: 7-9, 1945.

18 — *Pronocephalidae* (*Trematoda*). Estudo das espécies brasileiras e revisão da família.
Memórias do Instituto Butantan, 19: 249-372, 1946.

19 — Revisão do gênero *Cruzia* (*Nematoda* — *Oxyuroidea*), e estudo das espécies brasileiras.
Tese para Livre-Docência. 84 pp. 11 est. 105 figs. São Paulo. 1947.

20 — Considerações sôbre o gênero *Choledocystus* Pereira & Cuocolo, 1944.
Revista Brasileira de Biologia, 9 (2): 167-174, 1949.

21 — Notas Helmintológicas. 10 — Sôbre dois casos de parasitismo errático verificado no gênero *Opisthogonimus* (*Trematoda*: *Plagiorchiidae*).
Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia, U.S.P., 8: 99-103, 1950.
Em colaboração com A.T. Leão.

22 — Sôbre o sistema excretor dos trematoides do gênero *Opisthogonimus*. (*Trematoda*: *Plagiorchiidae*).
Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia, U.S.P., 8: 105-109, 1950.

23 — Estudo do sistema excretor de *Leptophyllum atenocotyle* Cohn, 1902. (*Trematoda*: *Plagiorchiidae*).
Memórias do Instituto Butantan, 23: 45-50, 1951.

24 — Sôbre a distinção genérica dos *Crotalidae* (*Ophidia*: *Crotaloidea*), baseada em alguns caracteres osteológicos. (Nota preliminar).
Memórias do Instituto Butantan, 23: 109-114, 1951.

25 — Nota sôbre a cercariofagia de um *Oligochaeta* do gênero *Chaetogaster* v. Baer, 1827.
Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia, U.S.P., 9: 51-56, 1951.

26 — Sôbre um novo *Gnathostoma* assinalado no Brasil. (*Nematoda*: *Gnathostomatidae*).
Memórias do Instituto Butantan, 24 (1): 37-44, 1952.

27 — Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematoides brasileiros. 2 — Fauna de Santos, Estado de São Paulo.
Memórias do Instituto Butantan, 24 (1): 17-36, 1952.

28 — Contribuição ao conhecimento das formas larvárias de trematoides brasileiros. 3 — Fauna de Belo Horizonte e Jaboticatubas, Estado de Minas Gerais.
Memórias do Instituto Butantan, 24 (1:) 45-62, 1952.

29 — Indices cercáricos específicos do *Schistosoma mansoni* verificados em Neves e Mariana, Estado de Minas Gerais.
Memórias do Instituto Butantan, 24 (1): 63-68, 1952.

30 — Noções técnicas aplicadas à epidemiologia da schistosomose. 1 — Captura de moluscos. Pesquisa e reconhecimento de cercárias.
Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia, U.S.P., 10: 41-62, 1952.

31 — Técnica de perfusão para a coleta de *Schistosoma mansoni* em animais de laboratório.
Memórias do Instituto Butantan, 24, (2): 101-110, 1952.

32 — Schistosomose experimental. 1 — Receptividade do *Procyon cancrivorus* à infestação pelo *Schistosoma mansoni*.
Memórias do Instituto Butantan, 24 (2): 111-114, 1952.

33 — Schistosomose experimental. 2 — Hermafroditismo do *Schistosoma mansoni* verificado em cobaia.
Em colaboração com E. Coelho.

34 — Sôbre o preparo do antígeno para intradermo-reação na schistosomose.
Trabalho apresentado na Sociedade de Biologia de São Paulo em 20 de janeiro de 1953. (Resumo mimiografado).

35 — *Australorbis immunis* (Lutz, 1918) hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* na cidade de Santos, Estado de S. Paulo.
Em colaboração com J. M. A. Carvalho.

36 — Notas Helmintológicas. *Aliptrema Ribeiroi* n. gen., n. sp., (*Trematoda*: parasita de ofídio brasileiro.
Arquivo do Museu Nacional, 42: 485-490, 1954.
Em colaboração com A. T. Leão.

37 — Preparo do antigeno para intradermo-reação na esquistossomose.
Memórias do Instituto Butantan, 25 (1): 5-14, 1953.

38 — Esquistossomose Experimental. 3 — *Cuniculus pacca pacca* e *Grison furax*, novos animais receptíveis à infestação pelo *Schistosoma mansoni*.
Memórias do Instituto Butantan, 25 (1): 23-26, 1953.

39 — Esquistossomose Experimental. 4 — *Nasua narica* e *Didelphis paraguayensis*, animais sensíveis à infestação experimental pelo *Schistosoma mansoni*.
Memórias do Instituto Butantan, 25 (2): 23-27, 1953.

40 — Processo rápido de perfusão do sistema porta de mamíferos para coleta de esquistosomatídeos, aplicável aos trabalhos de campo.
Memórias do Instituto Butantan, 25 (2): 29-33, 1953.

41 — Contribuição ao conhecimento das formas larvárias de trematoides brasileiros. 4 — Nota sôbre o sistema excretor da cercária de *Schistosoma mansoni*.
Memórias do Instituto Butantan, 25 (2): 45-52, 1953.

42 — Contribuição ao conhecimento das formas larvárias de trematoides brasileiros. 5 — Descrição de três furco-cercárias que ocorrem em planorbídeos e hospedeiros do *Schistosoma mansoni*.

Memórias do Instituto Butantan, 25 (2): 77-86, 1953.

43 — Estrigeidas de répteis brasileiros. (*Trematoda: Strigeata*).
Memórias do Instituto Butantan, 26: 257-278.
Em colaboração com J. M. Rangel.

44 — Situação sistemática de alguns gêneros e espécies da subfamília *Planorbidae* Pilsbry,

45 — Was ist eigentlich *Pentastoma megastoma* Diesing, 1836? (*Porocephalida: Porocephalidae*). Senckenbergiana biol., 37 (5/6): 469-485, 1956.
Em colaboração com F. da Fonseca.

46 — Esquistossomose Experimental. 5 — Dados sôbre a infestação Experimental de "Biomphalaria tenagophila" (Orbigny) e "Australorbis glabratus" (Say).
Revista Brasileira de Biologia, 17 (2): 179-185, 1957.

47 — Nematóides (Oxyuroidea) Parasitos de diplópodos da Ilha da Queimada Grande, São Paulo, Brasil.
Memórias do Instituto Butantan, 27: 51-66, 1955-6.
Em colaboração com E. Coelho.
Memórias do Instituto Butantan 24:115, 1952.

48 — Contribuição ao conhecimento dos planorbídeos da cidade de São Paulo.
Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, 9 (1): 57-65, 1957.

49 — Estudo sôbre "Planorbis melleus" Lutz, 1918. Posição das espécies no gênero "Drepanotrema" Fischer & Croxxe, 1880.
Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, 9 (1): 51-54, 1957.

50 — Nota sôbre "Drepanotrema malleum" (Lutz, 1918) e "D. cimex" (Moricand, 1837). *Molusca. Planorbidae.*
Revista Brasileira de Biologia, 18 (1): 109-111, 1958.

51 — No prelo:
Haplometroides Odhneri sp. n. e revisão do gênero *Haplometroides*.
Em colaboração com M.D. Perez.

Nota sôbre *Micrurus surinamensis nattereri* Schmidt e *Micrurus pyrrhocryptus* Cope

Por

ALPHONSE RICHARD HOGE

(Laboratório de Ofiologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

e

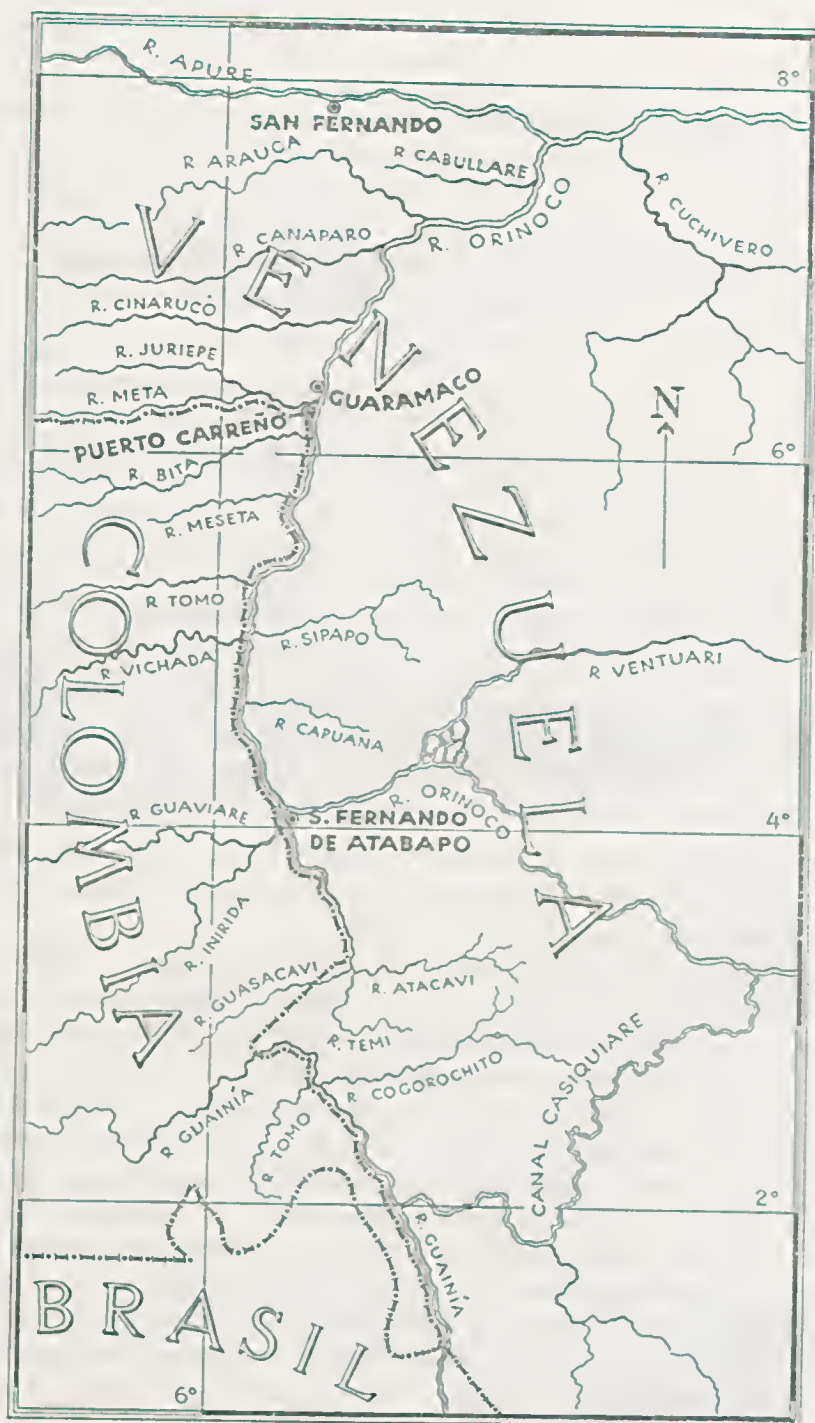
ABDEM RAMON LANCINI

(Museo de Ciências Naturales de Caracas, Venezuela)

Foram estudados os seguintes exemplares: N.º 420 no Museu Nacional do Rio de Janeiro, procedente do Alto Rio Negro, fronteira de Cucuy, (não Cucus como cita Schmidt) (*4*:8 e 28) Amazonas, Brasil. Esta localidade está situada no ponto trifronteiriço, Colômbia, Brasil e Venezuela. Colecionado por Carlos Lako (não Colonel Lako, como cita Schmidt) (*4*:28), em 1933.

Herp. 326 no Museu de Ciências Naturales de Caracas, coletado por J. M. Cruxent diretor do museu, nos arredores de San Carlos do Rio Negro, território Federal Amazonas, Venezuela em 21/4/1951.

Localização da "terra typica": Na descrição original (*4*:25) o tipo n.º 20708, no Senckenberg Museum, ♀, é dado com precedente de: "between Guaramoca and San Fernando, Venezuela", coletado por G. Huebner 1895. Na página anterior Schmidt dá mais exatamente "between Guaramoca and San Fernando, Upper Orinoco". No mapa que acompanha a descrição original (*4*:33 Fig. 6) a localidade tipo está marcada ligeiramente abaixo do paralelo 5. Posteriormente Roze (*3*:492) dá como distribuição geográfica na Venezuela "Estado Apure y Território Federal Amazonas". A localização da "terra typica" no Estado Apure por Roze é devida à uma confusão oriunda provàvelmente do fato de existirem na Venezuela duas localidades com o nome de San Fernando; San Fernando de Apure, capital do Estado de mesmo nome e situado no baixo Apure e outra San Fernando de Atabapo, situada na confluência do Rio Atabapo e o Alto Orenoco, aproximadamente à altura do paralelo 4, Território Federal Amazonas, Venezuela.

R. APURE
SAN FERNANDO
R ARAUCA
R CABULLARE
R. ORINOCO
R CUCHIVERO
R. CANAPARO
R. CINARUCO
R. JURIEPE
R. META
GUARAMACO
PUERTO CARREÑO
R. BITA
R. MESETA
R TOMO
R. SIPAPO
R VICHADA
R VENTUARI
R CAPUANA
R. ORINOCO
R GUAVIARE
S. FERNANDO
DE ATABAPO
R. INIRIDA
R. GUASACAVI
R. ATACAVI
R. TEMI
R COGOROCHITO
CANAL CASIQUIARE
R GUAINIA
R TOMO
R. GUAINIA
VENEZUELA
COLOMBIA
BRASIL
N
8°
6°
4°
2°
6°

Não há dúvida que o San Fernando mencionado, é San Fernando de Atabapo, pois no Catálogo da Coleção de Répteis do Museu Senckenberg (*1*:125) a procedência do tipo é citada como "zwischen Guaramaco und San Fernando, Alto Orenoco, Süd Venezuela". Ora, San Fernando de Atabapo está situada no Alto Orenoco, no sul da Venezuela, enquanto que San Fernando de Apure está situada no rio Apure e não Orenoco.

Quanto à Guaramaco, nenhum dos mapas recentes da Venezuela por nós consultados menciona essa localidade, porém o "Mapa de la República de Colômbia, escala: 1/2 000 000, construido con base en un levantamiento astronomico por la Oficina de Longitudes, entidad técnica adstrita al Ministério de Relaciones Exteriores, Bogotá — República de Colômbia 1939, (segunda edición), Instituto Geográfico Kummerly & Frey, Berna"; mostra que está localizada ligeiramente acima da confluência do rio Meta com o rio Apure e à margem esquerda do curso médio do rio Orenoco (6° 14′ N aproximadamente).

Nos atuais mapas da Venezuela porém, figura o povoado de Pto. Paez no mesmo lugar onde no mapa da Colômbia figura Guaramaco. Não obstante, não nos foi possível verificar se o atual Pto. Paez (Estado Apure) corresponde realmente ao antigo povoado de Guaramaco.

Tendo em conta o acima exposto, cremos ser conveniente definir a localidade típica de *Micrurus surinamensis nattereri* como: Entre Guaramaco e San Fernando de Atabapo, Alto Orenoco, Território Federal Amazonas e Estado Bolívar, Venezuela. (*)

Conhecem-se até o presente momento os seguintes exemplares:

Holotypo: n.° 20708, ♀, Mus. Senckb. coletado entre Guaramaco (e não Guaramoca como cita Schmidt) e San Fernando de Atabapo, No Alto Rio Orenoco, Território Federal Amazonas, Venezuela.

Paratypo: n.° 65163, ♀, Chicago Nat. Hist. Mus., mesma procedência do typo segundo Schmidt (*4*:28).

Paratypo: n.° 420, ♂, Museu do Rio de Janeiro, coletado por Carlos Lako na fronteira do Cucuy, Alto Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil, em 1933

Paratypo: s/n.° no Nat. Mus. de Viena, coletado por Natterer em Marabitanos, Estado do Amazonas, Brasil.

N.° 326, no Museu de Ciências Naturales de Caracas, Venezuela, coletado por J. M. Cruxent, diretor do Museu, nos arredores de San Carlos no Alto Rio Negro, Território Federal Amazonas, Venezuela em 21/4/1951; ventrais 191; anal 1/1; subcaudais 38; 6 1/3 manchas no corpo e 2/3 + 1 na cauda.

(*) O limite entre os Estados Bolivar e Território Federal Amazonas está um pouco acima de Pôrto Ayacucho (Amazonas).

Dimorfismo sexual: Em nota publicada anteriormente Hoge (2) descreveu o dimorfismo sexual na forma e extensão da faixa preta occipital em *Micrucus surinamensis surinamensis* (Cuvier). Não tendo visto na ocasião exemplares de *Micrurus surinamensis nattereri* Schmidt, não lhe foi possível julgar se o fenômeno era peculiar à espécie ou sòmente à raça.

Nos n.ºs 326 MCNe 420 MMR constatamos que têm o colar típico completo como o que foi observado em machos de *Micrurus surinamensis surinamensis* o que indica que provàvelmente *Micrurus surinamensis nattereri* tem o mesmo dimorfismo sexual na forma e extensão da faixa nucal como o descrito por Hoge (2). Falta porém examinar fêmeas para confirmar esta suposição.

Distribuição Geográfica: Até o momento *Micrurus surinamensis nattereri* é conhecido como sendo das terras baixas do Alto Rio Negro (Estado do Amazonas, Brasil) e do Alto Orenoco (Território Amazonas, Venezuela). As regiões assinaladas estão submetidas à influência do clima AF de Köppen.

Distribuição na Venezuela: Curso superior do Rio Orenoco; Alto Rio Negro.

Micrurus pyrrhocryptus Cope 1862 — Recentemente Hoge descreveu *Micrurus tricolor* porém, confrontando *tricolor* com dados que nos foram fornecidos por J. Roze, sôbre o tipo de *M. balzani* que é sinonimo de *M. pyrrhocryptus* Cope, chegamos a conclusão que *Micrurus tricolor* Hoge deve passar para a sinonimia de *M. pyrrhocryptus*.

RESUMO

A "terra typica" de *Micrurus surinamensis nattereri* foi localizada exatamente e constatado que os machos têm colar occipital prêto, idêntico ao descrito por Hoge (2). *M. tricolor* passa para a sinonimia de *M. pyrrhocryptus*.

ABSTRACT

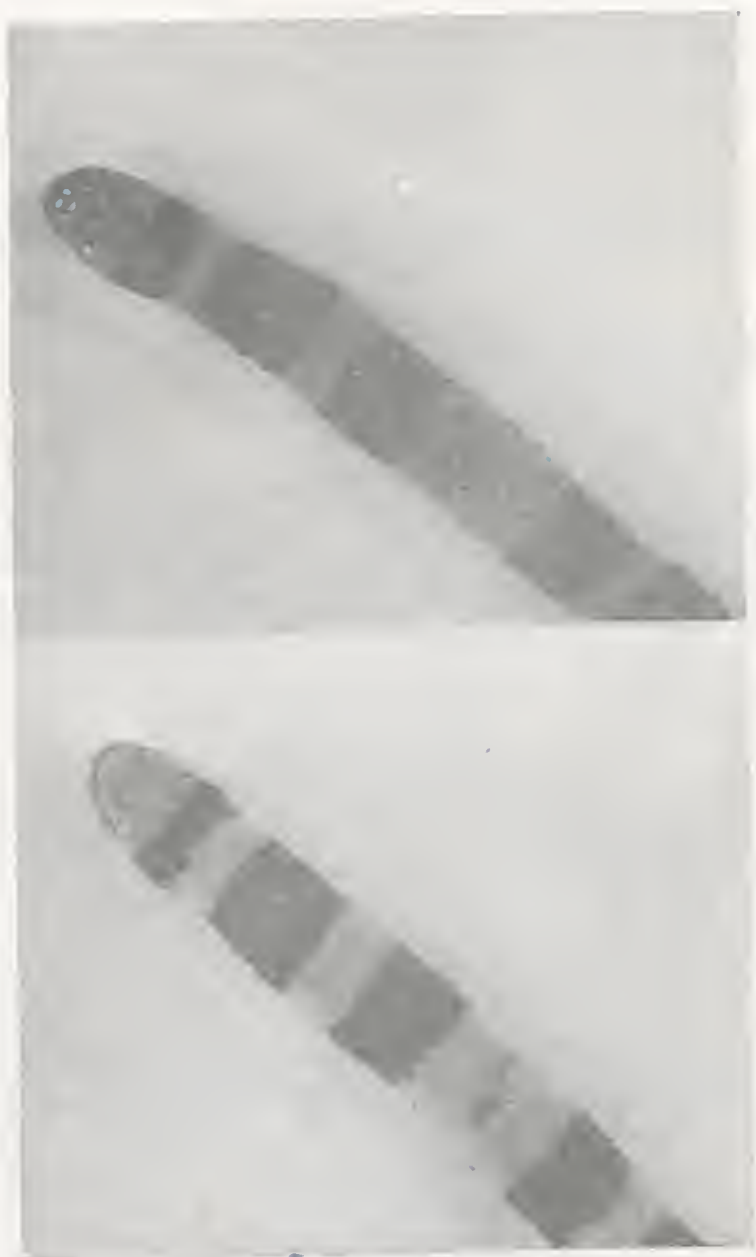
The "type locality" is fixed as: between Guaramaco and San Fernando de Atabapo, Território Federal Amazonas, Venezuela". instead of: .... and San Fernando de Apure as stated by Roze. The presence of a black occipital colar in males, identical to those described by Hoge (2) for *Micrurus surinamensis surinamensis*, was observed. *M. tricolor* pass to the synonime of *M. pyrrhocryptus*.

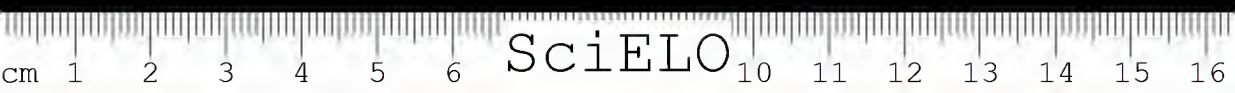
BIBLIOGRAFIA

1 — Boettger, O — Katalog der Reptilien Sammlung in Museu der Senckenbergischen Naturforschende Gesellschaft, in Frankfurt am Main. II. (Schlangen) I-IX + 1-159. 1898.

2 — Hoge, A. R. — Três notas sôbre serpentes brasileiras. 3. Dimorfismo sexual em *Micrurus surinamensis surinamensis* (Cuvier) 1817 (Elapidae). *Pap. Avulsus do Dep. Zool.*, 13 (17):223-225. São Paulo, 1958.

3 — Roze, J. A. — Revision de las Corales (Serpentes: Elapidae) de Venezuela. *Acta Biol Ven.*, *1* (17):545-500 + pl., 1955.

4 — Schmidt, K. P. — The Surinam Coral Snake — *Micrurus surinamensis*. *Fieldiana. Zoology Chicago Nat. Mus.*, *34* (34):25-34 + pl., 1952.

N.º 420 — M. N. R. — Parátipo de Micrurus Surinamensis Nattereri.

Mem. Inst. Butantan,
29:15-16. 1959.

SERPENTES COLETADAS EM JACAREACANGA, ESTADO DO PARÁ, BRASIL

Por

ALPHONSE RICHARD HOGE e HÉLIO EMERSON BELLUOMINI

(*Laboratório de Ofiologia do Instituto Butantan, São Paulo*)

Durante uma estadia de três dias em Jacareacanga, situada na margem esquerda do Rio Tapajoz, Estado do Pará, Brasil conseguimos capturar algumas serpentes entre as quais uma espécie até agora não assinalada para o território brasileiro. Acompanhou a excursão o Dr. Gastão Rosenfeld, chefe do Laboratório de Fisiopatologia e diretor do Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan.

Família ANILIDAE

Gênero **Anilius**

Anilius scytale scytale (Linné)

1758 *Anguis scytale* Linné — *Syst. Nat.* 10 dd., *1*: 228

1 exemplar n.º 17317, ♀, capturado durante uma derrubada de árvores às margens de um igarapé. O exemplar estava debaixo das raízes da árvore derrubada.

Dorsais 21; ventrais 253; subcaudais 9 + 3/3; anal 1: 6 supralabiais; 6 infralabiais.

Usamos a nomenclatura trinominal por ter Roze (2) descrito a raça *Anilius scytale phelpsorum* oriundo da Venezuela, localidade tipo Auyantepui, Estado e Bolivar.

Família BOIDAE

Gênero **Boa**

Boa constrictor constrictor Linné

1758 *Boa constrictor* Linné — *Syst. Nat.* 1.ª ed. *1*:215.

Dois exemplares n.º 17318 ♀ e 17319 ♂, capturados em Dezembro de 1959, na Casa de Máquinas da Base Aérea.

N.º 17318, ♀, dorsais 89; ventrais 243; subcaudais 50; anal 1; supralabiais 20-22; infralabiais 25-27.

N.º 17319; ♀, dorsais 93; ventrais 243; subcaudais 50; anal 1; 20-22 supralabiais; 25-26 infralabiais.

Família COLUBRIDAE

Gênero **Spilotes**

Spilotes pullatus pullatus (Linné)

1758 *Coluber pullatus* Linné — *Syst. Nat.*, 10ª ed., *1*:325.

1 exemplar n.º17316. ♀; dorsais 15; ventrais 206; subcaudais 97/97; anal 1; 8-8 supralabiais; (2 intercalados do lado direito); 8-8 infralabiais.

Gênero **Urotheca**

Urotheca brevirostris (Peters)

1863 *Dromicus brevirostris* Peters — *Mbr. Berlin Akad., 1863*: 280.

1 exemplar n.º 17320, ♀; dorsais 17; ventrais 158; subcaudais 67/67; anal dividido; 8-8 supralabiais; 10-10 infralabiais.

Esta espécie descrita por Peters baseada num exemplar procedente provàvelmente de Quito, Equador, não tinha, até o momento, sido assinalado para o território brasileiro. O exemplar em questão concorda perfeitamente com a descrição original.

RESUMO

Entre o material capturado encontra-se um exemplar de *Urotheca brevirostris* (Peters) que é o primeiro assinalado para o território brasileiro.

ABSTRACT

Among the material refered in this paper there is a specimen of *Urotheca brevirostris* (Peters) which is the first collected in brazilian territory.

AGRADECIMENTOS

Viajamos em avião cedido pela Base Aérea de Cumbica da F.A.B.

Aproveitamos a oportunidade para agradecer as facilidades concedidas pelo Snr. Cel. Ivo Gastaldoni e à Tripulação do Avião, Capitães Motta Pais, Barbieri e Sargento Drumond.

BIBLIOGRAFIA

1 — *Peters* — Peters berichtete über einige neue oder weniger bekannte Schlangenarten des zoologischen Museums zu Berlin. *Sitz. der Phys.-math. Klasse*, pp. 272-289. 1863.

2 — *Roze, J. A.* — Los reptiles de Auyantepui, Venezuela, *Acta Biol. Venezuelica*, *2* (22): 243-270. 1958.

SEXUAL ABNORMALITIES IN *Bothrops insularis* (Amaral) 1921

(SERPENTES)

Alphonse Richard Hoge and Hélio Emerson Belluomini

(Laboratório de Ofiologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

Giorgio Schreiber

(Instituto de Biologia da Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil)

Adolpho Martins Penha

(Instituto Biológico, Divisão de Defesa Animal, S. Paulo, Brasil)

INDEX

BRAZIL
24°30
46°30'
SOUTH AMERICA
QUEIMADA GRANDE ISLAND
WOODS
GRASSLANDS
APROX. SCALE - 1:10.000
MAP SHOWING THE DISTRIBUTION OF WOODS AND GRASSLANDS, BASED SHIEFLY ON AEROPHOTOGRAFIES FROM BRAZILIAN AIR FORCE, ESTEREOPHOTOGRAMETRIC RECONSTITUTION BY VASP AEROFOTOGRAFIA S/A AND COLLECTED BY INSTITUTO BUTANTAN

1. — *INTRODUCTION*

At the 9 th International Congress of Genetica (1953) Hoge, Bellnomini and Schreiber (38) presented the problem of the sexual abnormalities of *Bothrops insularis* (Amaral) 1921, a snake restricted to the "Queimada Grande" island at the coast of São Paulo, Brasil. (Plates 1 and 2). Detailed data are now added as a result of further captures and a deeper statistical and embryological analysis of the material.

Bothrops insularis (Amaral) 1921 (2 and 3) "jararaca ilhôa" (plate 3) (popular name), differs from all other snakes in having a certain number of female individuals with a more or less developed hemipenis (plate 4). This hemipenis can be present on one or on both sides. As in some of these individuals eggs with advanced embryos have been found, it was deemed interesting to study those embryos presenting a hemipenis at different stages of development.

In the population of the island three main groups of individuals can be distinguished: true males, females without hemipenis, and females having bilateral or unilateral hemipenis. For the present, we shall call this last group "intersexes". Later, the real meaning of the sexual abnormalities will be discussed in order to find out whether they represent a true intersexuality, a restricted type of gynandromorphism, or a new type of abnormality.

Plate 2 A and *B*. General views of the Island Queimada Grande, Brazil

Plate 3. Dissected male specimen of *Bothrops insularis* showing gonads arrows, and hemipenis injected with paraffin.

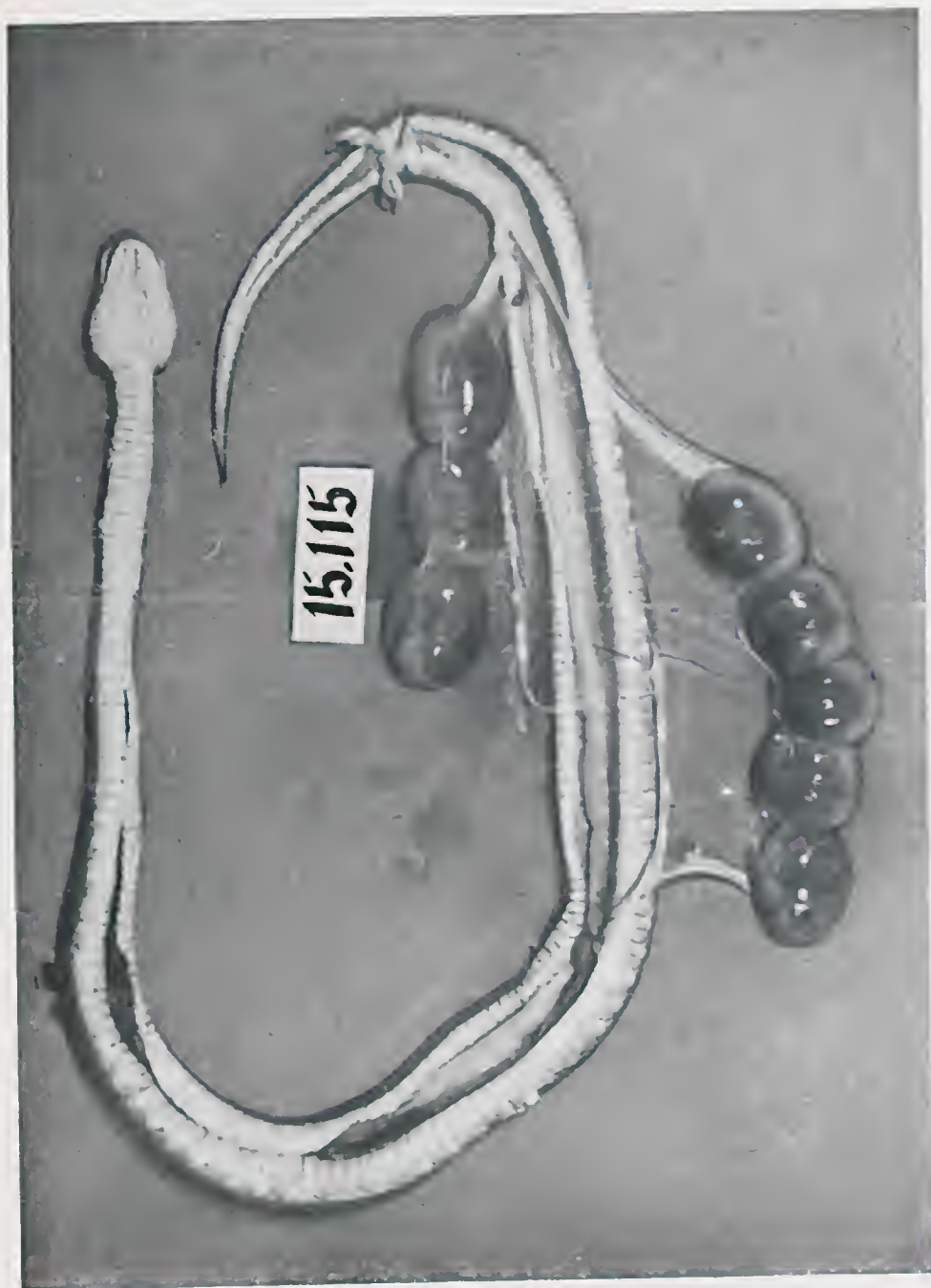



Plate 4. Dissected pregnant intersexes with embryonated eggs, oviducts, and hemipenis injected with paraffin (photograph *a*)

2. — *HABITAT, MATERIALS AND PROBLEMS*

The island "Queimada Grande" is situated in the South Atlantic at 24° 28' south and 46° 42' west Greenwich, approximately 40 miles off the harbour of Santos, and has about 430.000 m² with a maximum elevation of 200 meters above see-level (Plate 5 a).

It is of continental formation, having the same geological formation as the coast, from which it is separated by a shallow sea. No climatological data exist, but the island belong to the Af. Zone (climate) of Koeppen (52), which means tropical humid. The countless visits done by one of the authors (Hoge) permitted the observation that, though there is no really dry season, the rains are relatively rare as compared to the continent, and the climate might not be Af. (perhaps Am).

The sea surrounding the island is extremely rich in fishes and for that reason the island is visited frequently by fishermen. However, they seldon go on shore, because they are afraid of the numerous snakes which abide the island and which have already caused some fatal accidents. Many tales go around among the sailors about shipwrecks and the island's snakes. The island is completely uninhabited. Its fauna is rich in sea birds (*Sula leucogaster* and *Fregata fregata*) and small terrestrial birds. The herpetological fauna consists in the *Bothrops insularis* (Amaral) 1921 (Serp. Crotal.), which is the dominating species and characteristic of the island, having never been captured elsewhere. Another snake, *Dipsas albifrons cavalheiroi* Hoge 1950 (Serp. Colubrin.), and the following lizards complete the land reptilian fauna of the island: *Leposternon microcephalum* Wagler 1824, *Amphisbaena darwinii* subsp., *Colobodactylus taunay* Amaral 1932, *Mabuya macrorhyncha* Hoge 1946, and *Hemidactylus mabouia* (Moreau de Jonnès 1818. Leão (54) related two kinds of *Anura*.

It is difficult to determine for how long the species *Bothrops insularis* has been isolated, since we have evidence that an island can be repopulated by snakes within a relatively short time, even very distant from the continent (Krakatoa after the eruption) Dammarmann (14). It is not an easy problem to ascertain the duration of the period required for the speciation. During the last glaciation (about 20.000 years ago) the island has probably been connected with the continent. As no specimen of *insularis* has been found on the continent, the problem of the specification of *Bothrops insularis* as differentiated from other similar island species must be considered in two ways. Either *B. insularis* existed previously on the continent as well as on the island and disappeared from the continent by negative selection, but persisted in the special habitat of the island, or the differentiation of *insularis*

Plate 5 a. Partial view taken from the Island Queimada Grande showing woods and grassland. (Photograph taken by Pirozelli).

Plate 5 b. *Bothrops insularis* in its habitat (Photograph taken by Pirozelli)

as a new species took place from a related species which reached "Queimada Grande" after its separation from the continent.

Amaral (2) describd the species in 1921, based on 203 specimens, which were captured by the lightmen and sent to the Instituto Butantan between 1914 and 1920. Amaral visited the island and captured several snakes. Hoge (35 and 36) started his expeditions to the island in 1946 and brought back a collection of specimens. In 1952 Belluomini and Hoge observed that one of the specimens of *Bothrops insularis* (N.º 13992) possessed ovaries in the abdominal cavity, as well as follicules, oviducts and an atresic egg. This specimen, which had died in the terrarium of the Instituto Butantan and whose hemipenis was prepared and injected with paraffin, seemed to be a male. The absence of testicles was stated. Morphologically the snake appeared to be completely normal and did not show any external difference which might demonstrate such abnormality. Other snakes of the same species were investigated, specially since in his paper based on Amaral's data Klauber (50,51) showed no noticeable sexual dimorphism.

A large overlapping between males and females was stated in the specimens described by Klauber (50,51). We observed that the sexual abnormality was much more frequent than expected and after the examination of all the specimens of *Bothrops insularis* existing in the collection of the Instituto Butantan the intersexuality was demonstrated. Sex was determined by opening the abdominal cavity of the snakes to look for the presence of ovaries, testicles, eggs and oviducts. The tail was also opened to search for invaginated uni or bilateral hemipenis.

The present research aims a first contribution to the study of variation frequency in the population, by analysing the variation of the hemipenis character in the two groups of snakes during the period of 25 years.

In 1920 Amaral visited the island, and during his visit collected more snakes for the collection of the Institute. From 1946, when Hoge visited the island for the first time, until 1953 the island has been visited about 10 times in order to obtain more material. This material is divided in two groups: the first one consisting of snakes collected between 1914 and 1921, and the second one of those captured from 1946 to 1953. These two groups, each covering a period of about ten years and being separated by a gap of nearly 25 years, constitute a highly interesting material for the statistical study of the evolution of sex ratio in the population. The fact that this population is strictly localized and geographically isolated from any other similar species adds a new interest to the study of population genetics of this character, i.e. the presence of the male copulatory organ in many female individuals.

Plate 6 a and b. *Bothrops insularis* in its habitat (Photographs taken by Pirozelli)

Bothrops insularis can be found on trees or on the ground (plates 5 b and 6). Small birds constitute the normal food of the snakes; examination of the stomach content reveals occasional lizards (*Hemidactylus mabouia*) and in one case we found a *Dipsas albifrons cavalheirai*. Frequently chilopods are found in the stomach of young specimens. The protective yellowish-brown coloration fits well the foliage on the ground and the rocks. The first description of *Bothrops insularis* reports it as "semi-arboreal", but further observations revealed the same habitat for the continental "jararaca" *Bothrops jararaca*. The arboreal habitat is perhaps more frequently used by *Bothrops insularis* because of the total absence of mammalian fauna on the island, so that birds are the chief food reserve of the snakes. Tables I and II give the indication of the whole material here studied, which will be analysed in chapters 3 (Statistic) and 4 (Embryology).

3. — *Statistical Researches*: *ANALYSIS OF THE QUANTITATIVE DIFFERENCES OF CHARACTERS BETWEEN SEXES.*

The statistical researches have been carried out along two main lines: 1 — the analysis of quantitative characters that could eventually differentiate both sexes and intersexes and 2 — the statistical treatment of the sex ratio of the two groups in order to investigate the trends of the genetic constitution of the population or other evolutionary facts.

A — *Biometrical Determination of the Genetical Sex.*

Some characters well suited to quantitative statistical analysis, for example number of scales (ventrals, dorsals and subcaudals) (46,51) are, generally speaking, a good discriminating criterion for sex. We studied in *Bothrops insularis*, in both the first and second group, the statistical distribution of these pholidotic characters in individuals classified as males, females and intersexes. The sexual classification has been based on the presence of testicles and hemipenis in males, the presence of ovaries and oviducts and absence of hemipenis in the females, and ovary, oviducts and hemipenis for the intersexes (See tables I and II).

We must state here that Klauber in 1943 (50), in a paper dealing with sex dimorphism in *Bothrops insularis*, concluded that in this species the statistical analysis of the pholidosis does not clearly define the sex. The data analysed by Klauber are those published by Amaral before the discovery of the sexual abnormality of this species, and thus the conclusions of this author cannot actually be taken into consideration. The first attempt to analyse statistically the sex differences in *Bothrops insularis* has been made by comparing head, body and tail length in the three groups of males, females and intersexes. The two samples constituted by the two groups of snakes captured

TABLE I

Sex distribution of the individuals analysed

Numbers of the Collection from the Institute Butantan

Males:

666	*1854*	*1885*	*1938*	*1962*	*1977*	2034	2087	14083	14481	15114	15543
667	*1855*	*1886*	*1939*	*1963*	*1980*	2042	3091	14186	14482	15119	15694
668	*1864*	*1887*	*1941*	*1964*	*1983*	2047	14000	14187	14487	15120	15740
670	*1865*	*1895*	*1942*	*1965*	*1984*	2048	14001	14188	14490	15123	15742
674	*1867*	*1899*	*1943*	*1966*	*1991*	2051	14012	14189	14491	15126	15743
675	*1870*	*1905*	*1944*	*1967*	*1992*	2052	14036	14190	14494	15127	15834
676	*1873*	*1907*	*1945*	*1969*	*1994*	2054	14037	14229	14495	15128	15806
679	*1875*	*1911*	*1951*	*1970*	*1995*	2055	14059	14231	14497	15136	15815
682	*1876*	*1918*	*1952*	*1971*	*2006*	2057	14060	14233	14500	15140	15852
684	*1877*	*1928*	*1953*	*1972*	*2008*	2069	14062	14295	14507	15146	15854
685	*1880*	*1932*	*1956*	*1974*	*2017*	2070	14064	14313	14510	15150	Total 154
1254	*1882*	*1933*	*1960*	*1975*	*2020*	2071	14068	14478	14515	15175	
1731	*1884*	*1937*	*1961*	*1976*	2021	2074	14082	14489	15004	15183	

Intersexes:

Hemipenis present in the right side:

669	*1890*	*1934*	*1992*	2043	13014	14072	14261	14512	15133	15805
671	*1897*	*1940*	*1993*	2044	13926	14075	14294	14577	15137	15807
673	*1900*	*1946*	*1996*	2045	13998	14077	14321	15111	15138	15811
678	*1908*	*1947*	*1999*	2050	14011	14079	14334	15112	15142	15869
688	*1909*	*1949*	*2001*	2056	14016	14084	14359	15113	15144	Total:
1737	*1913*	*1954*	*2007*	2058	14025	14086	14483	15116	15451	105
1739	*1914*	*1955*	*2019*	2076	14038	14213	14492	15117	15695	
1881	*1925*	*1957*	2025	2162	14063	14228	14496	15121	15739	
1883	*1929*	*1959*	2040	3086	14065	14239	14499	15129	15801	
1889	*1930*	*1978*	2041	3089	14071	14269	14503	15132	15892	

Hemipenis present on the left side: — Only the number 2027

Hemipenis present on both sides (left and right)

665	[illegible]	*1893*	*1998*	14010	14070	14227	14485	15115	15160
672	*1874*	*1901*	2233	14013	14074	14236	14486	15118	15171
683	*1878*	*1916*	2156	14017	14076	14281	14489	15122	15174
686	*1888*	*1930*	13998	14044	14078	14293	14493	15125	15223
1857	*1890*	*1927*	13996	14049	14080	14476	14505	15130	15695
1866	*1891*	*1936*	14002	14058	14087	14477	14509	15133	15861
1871	*1892*	*1979*	14008	14069	14088	14484	14511	15145	15867
									Total: 70

Females:

677 (15007)	1932	2033	3069	14073	14508
680	1935	2046	14003	14085	15619
681	1950	2053	14006	14089	Total: 37
1869	1958	2068	14007	14232	
1872	1968	2075	14040	14296	
1904	2013	2077	14066	14351	
1922	2032	2078	14067	14498	

Hermaphrodite: n.º 15843

The italic numbers correspond to the paratypes of the first sample whose sexes were re-checked. The number 1936 correspond to the Type of *Bothrops insularis*

TABLE II

Intersex individuals included in table I which were found to be pregnant.
Both samples presented a 10% occurance of pregnancy.

First sample		
Hemipenis present on the right side Col. I. B. n.°	Right oviduct	Left oviduct
1737	7 embryonated eggs	1 embryonated eggs
1914	2	5 .. ..
2013	5 . ..	5 .. .
Hemipenis present on both sides: Col. I. B. n.°		
665	3	2 .. ..
686	3	3 .. ..
1878	4 . ..	6 .. ..
1888	6	4 .. ..
1998	3	7 .. ..
Second sample		
Hemipenis present on the right side Col. I. B. n.°	Right oviduct	Left oviduct
15111*	3 embryonated eggs	2 embryonated eggs
15831	6	4 . ..
15832	2 atresic eggs. 1 embryonated eggs	2 .. ..
15893	7 embryonated eggs.	
15860	2 atresic eggs. 4 embryonated eggs.	1 embryonated eggs.
Hemipenis present on the both sides: Col. I. B. n.°		
15115*	5 embryonated eggs.	3 embryonated eggs
15122	2 .. . 2 atresic eggs.	1 atresic egg
15130	3 embryonated eggs 3 atresic eggs	
15174 Birth of 5 off-springs. 3 died posteriorly		
14485 Eggs at the initial phasis of development		

* These were studied embryologically.

respectively in 1914-1921 and 1946-1953, have been treated separately and in the histograms are represented by different lines. In all calculations these two groups have been kept separate in order to see if there have been variations in this lapse of time. In view of the fact that the size of the animal, or parts of it, can be influenced by ecological and by ageing factors, a successive analysis has been carried out in the same way as the preceding one, the scale numbers being used as the statistical variable factors. *

The statistical analysis of both length measurements and scale numbers leads approximately to the same conclusions, *i.e.* the scale counts show sharper differences between the sexes. The relation between scale number vertebrae and ribs in snakes are well stablished by Gadow (30). The increase in number of vertebrae in Ophidia is a philogenetic problem largely discussed by Sewertzoff (70) and reviewed from the modern evolutionary point of view by Goldschmidt (33-34).

The genetic influence on the metamerization of the vertebral column is discussed by Kuhne (53) and Fischer (22). All these facts give the scale number a relevant position as a criterion for the determination of the genetical sex, because the segmentation of the mesoderm into somites is an embryological step that occurs far before the appearance of the gonadic ridge and the sexual differentiation of the gonads. It must therefore depend only on the genetic individual constitution XX or XY, being a true somatosexual trait, like all the sexual characters of insects, and not influenced by the hormones.

The biometrical analysis for the genetical sex has been carried out by the following methods:

1 — Analysis of the variability of body length (head, body and tail) of males, females and intersexes, considering the two groups.

2 — Scale countings (dorsal, subcaudal and ventral) in the same individuals as "1".

3 — Regression line between body and tail length.

4 — Scatter diagram correlating to ventral and sub-caudal scales.

5 — Study of the "discriminating function" between two groups of three characters: first body, tail and head length and second, dorsal, ventral and subcaudal scales.

The methods indicated at 1 and 2 consider each character independently from this variability; the methods indicated at 3 and 4 analyse the relationships

* This number is a quantitative character fixed during the early period of development and is far more exact than a differential criterion, both for sexes and as taxonomic character.

between two characters related to sex differentiation, and finally the method indicated at 5 considers jointly three characters for the evolution of the sex differences.

1 — *Analysis of the Variability of Length*

Figs. 1, 2, 3 show the following facts: the head of females is slightly longer than that of males. The intersexes appear to be definitively females. An interesting increase in the head length in intersexes of the second group of captures is clearly evidenced. Statistical significance is given by the gra-

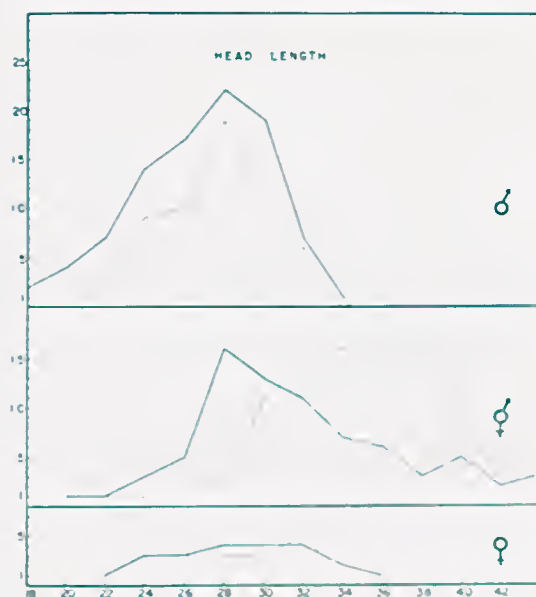



Fig. 1. Frequency distribution of the head length of males (♂), intersexes (⚥) and females (♀) of snakes collected between 1914-1920 (full lines) and of snakes collected 1946-1953 (broken lines). Ordinates: number of snakes. Abscissae: head length (mm).

phical method (see fig. 4). Body length is also larger in females than in males, and the intersexes behave also in their character as females. The increased body length in females and intersexes is also clearly indicated for the second group of captures (fig 2). The tail length of the snakes is generally larger in males than in females. These facts are shown in Fig. 3. The intersexes of the first group of captures behave as females, but in the second group there is a clear increase in the length, the second group of intersexes being were more masculine than the first one (Fig. 3).

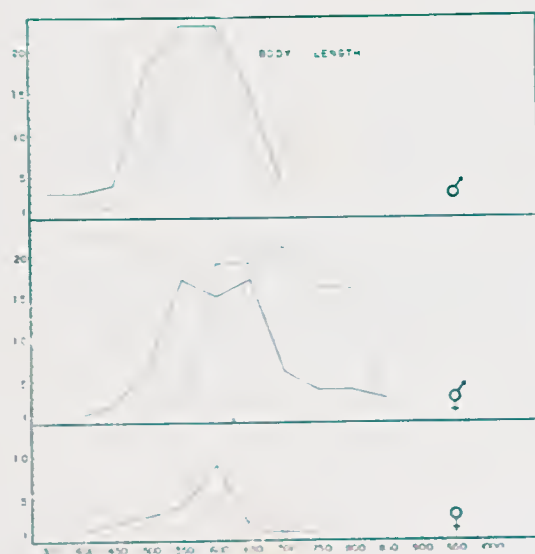



Fig. 2. Frequency distribution of the body length of males (♂), intersexes (⚥) an
females (♀) of snakes collected between 1914-1920 (full lines) and 1946-195
(broken lines). Ordinates: number of snakes. Abscissae: body length (mm
The open circle corresponds to a hermaphrodite individual.

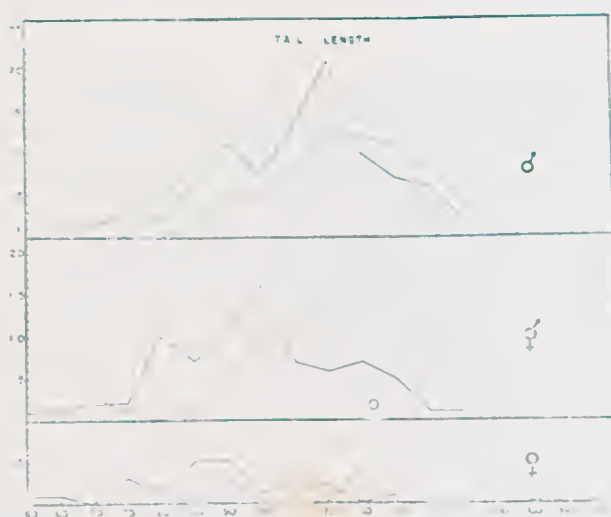



Fig. 3. Tail length of males (♂), intersexes (⚥) and females (♀) of snakes collect
between 1914-1920 (full lines) and between 1946-1953 (broken lines). Ordinate
number of snakes. Abscissae: tail length (mm). The open circle correspon
to a hermaphrodite individual.

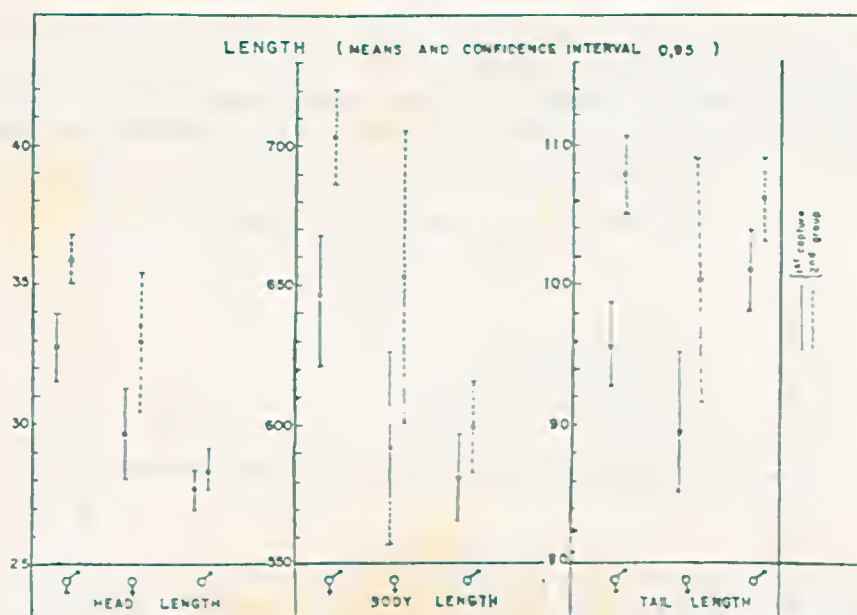



Fig. 4. Confidence intervals at the level of 0,95 probability of the head-body-and tail length length of intersexes (⚥), females (♀) and males (♂) of snakes collected between 1914-1920 (full lines) and between 1946-1953 (broken lines).

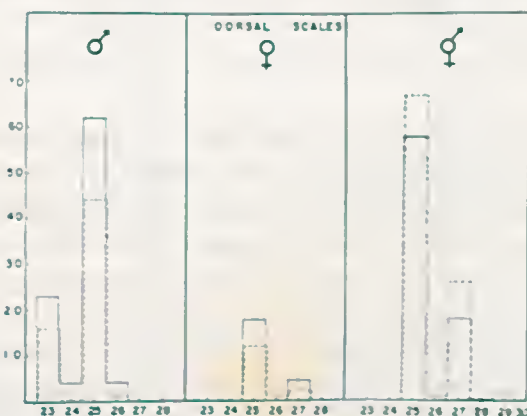



Fig. 5. Frequency distributions of the number of dorsal scales of males (♂), females (♀) ande intersexes (⚥) of snakes collected between 1914-1920 (broken lines) and between 1946-1953 (full lines).

2 — *Scale Number*

As previously stated this character shows the differences between sexes more clearly than length measurements. The number of ventral scales indicates that the intersexes belong to the female group, although slightly deviated towards the male mean. The difference, however, is not statistically significant (see Figs. 5, 6, 7. and 8). No differences in their characters appear between

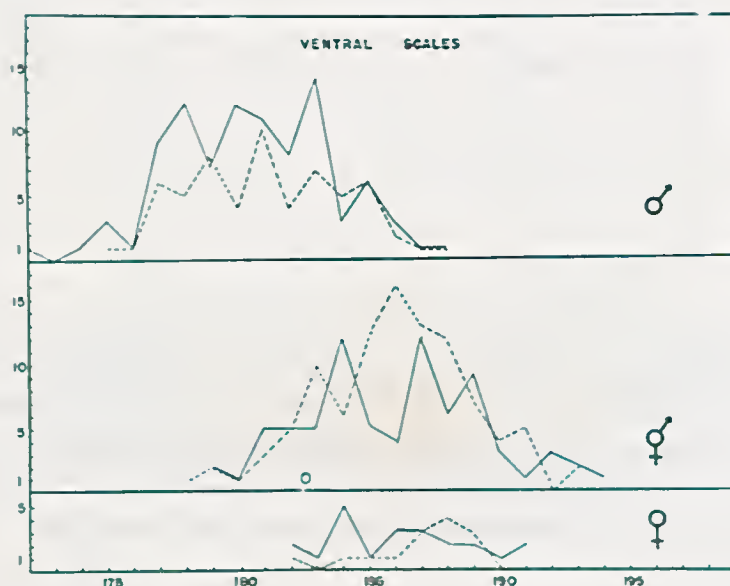



Fig. 6. Frequency distributions of the number of ventral scales of males (♂), intersexes (⚥) ande females (♀) of snakes collected between 1914-1920 (broken lines) and between 1946-1953 (full lines). The open circle corresponde to a hermaphrodite individual.

the two groups. This fact probably indicates that only ecological factors act on the body size of the two groups. The number of *subcaudals* shows that the intersexes belong to the female phenotype and practically does not differ between the two groups of captures, in spite of the fact that the intersexes bear the male copulatory organ. The number of subcaudals is typically female and differs significantly from that of the male. The number of the *dorsal* scales is not so sharply demonstrative as the number of ventrals and subcaudals, but as Fig., 5 shows, the modal number is 25 in the males with 23 as minor mode. Females show the same main mode at 25, a second one being also evident in 27 and there is an indication for a deviation towards a mode at 27, but not at 23. The female type of scaling here is true higher than in the true females.

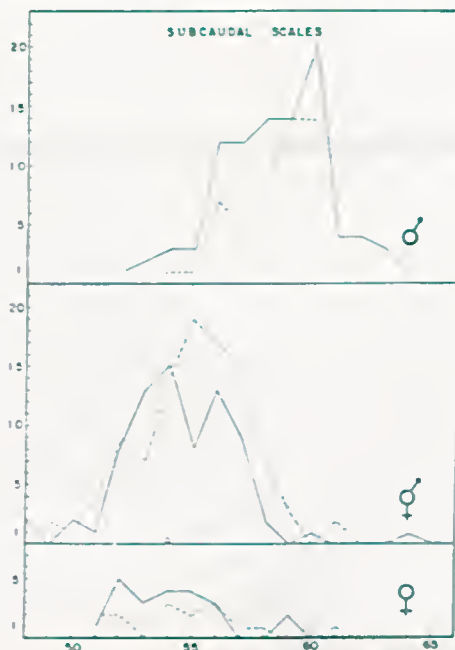



Fig. 7. Frequency distributions of the number of subcaudal scales males (♂), intersexes (⚥) and females (♀) of snakes collected between 1914-1920 (broken lines) and between 1946-1953 (full lines). The open circle corresponds to a hermaphrodite individual.

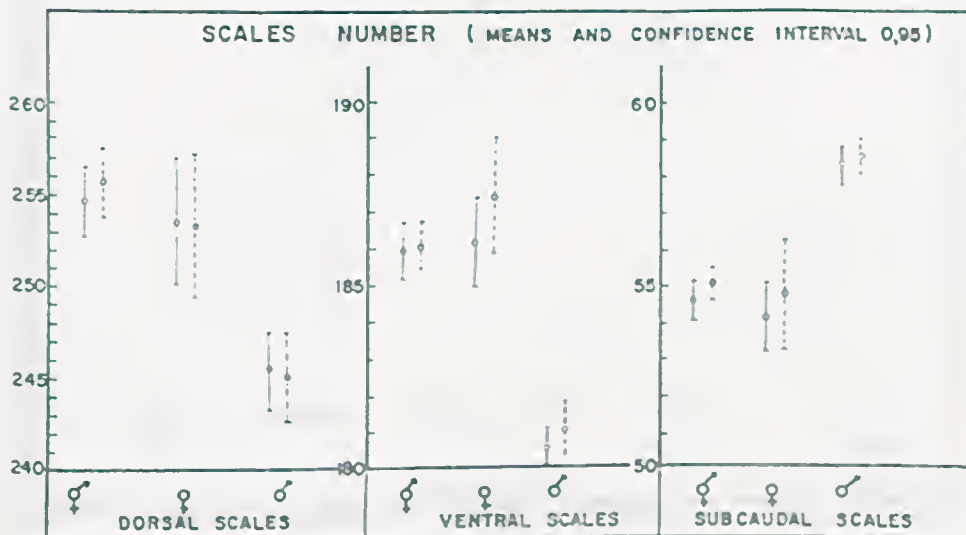



Fig. 8. Confidence intervals, at the level of probability of 0,95 of the averages of numbers of dorsal, ventral and subcaudal scales of intersexes (⚥), females (♀) and males (♂) of snakes collected between 1914-1920 (full lines) and between 1946-1953 (broken lines).

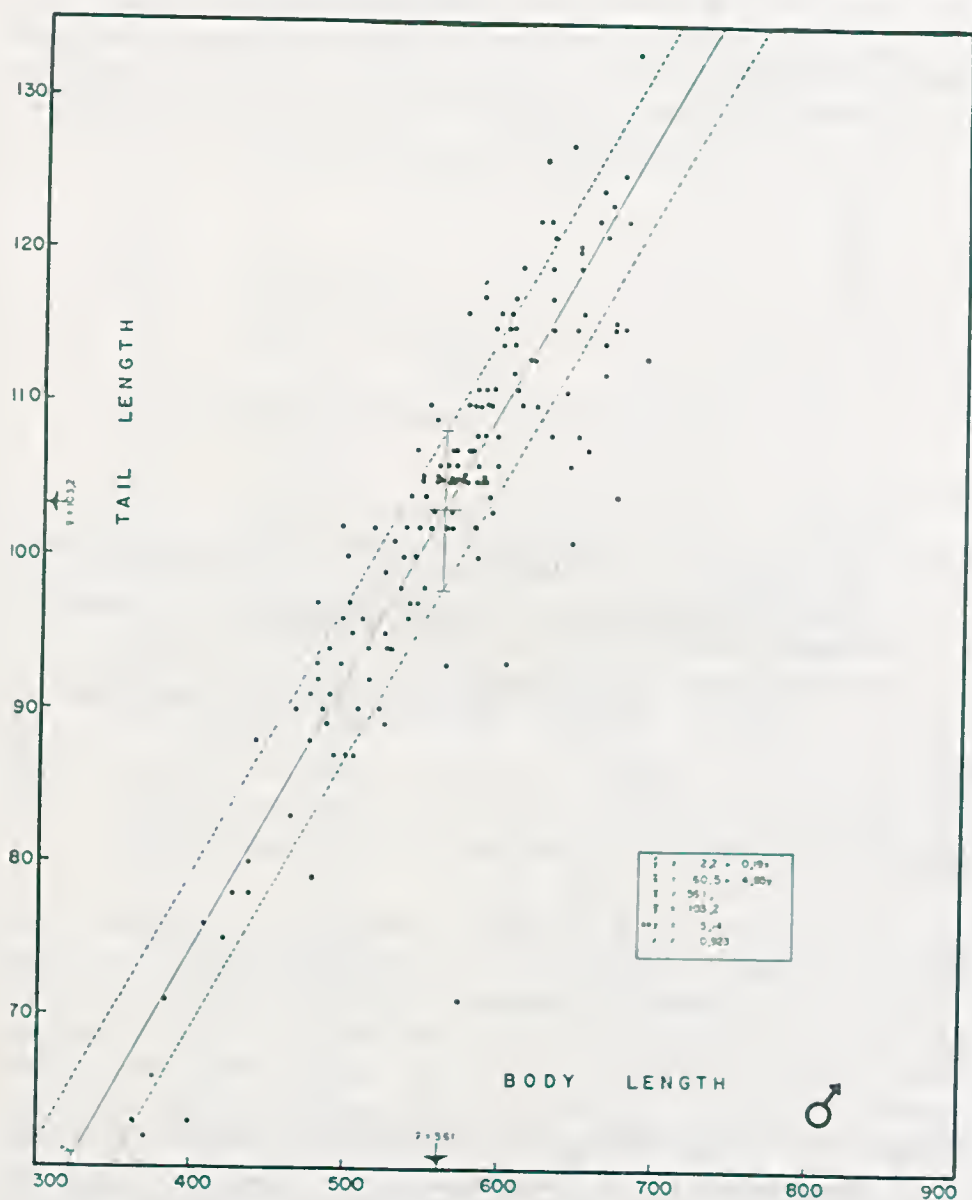



Fig. 9. Tail-body length regression line for all males snakes included in table I.

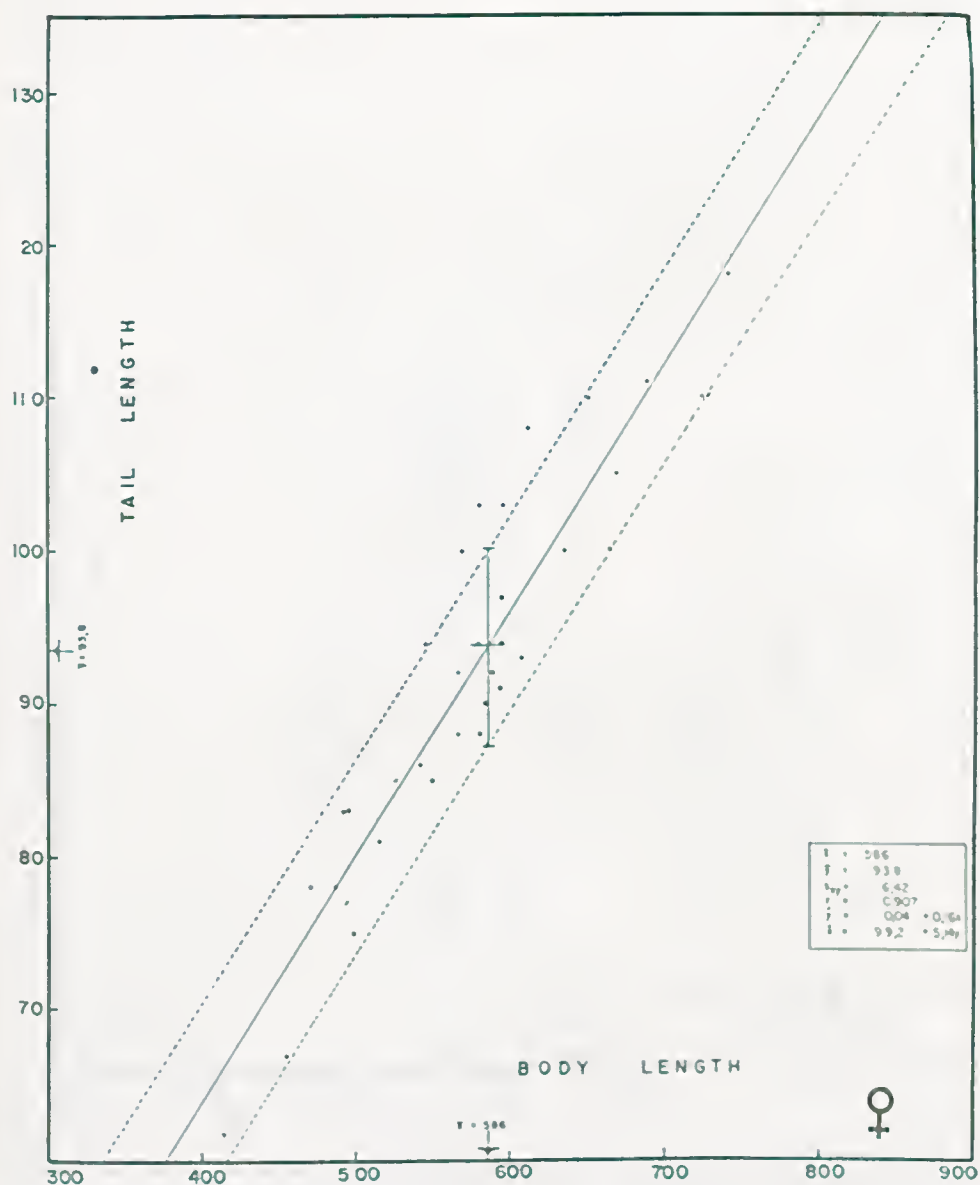



Fig. 10. Tail-body length regression line for all females snakes included in table I.

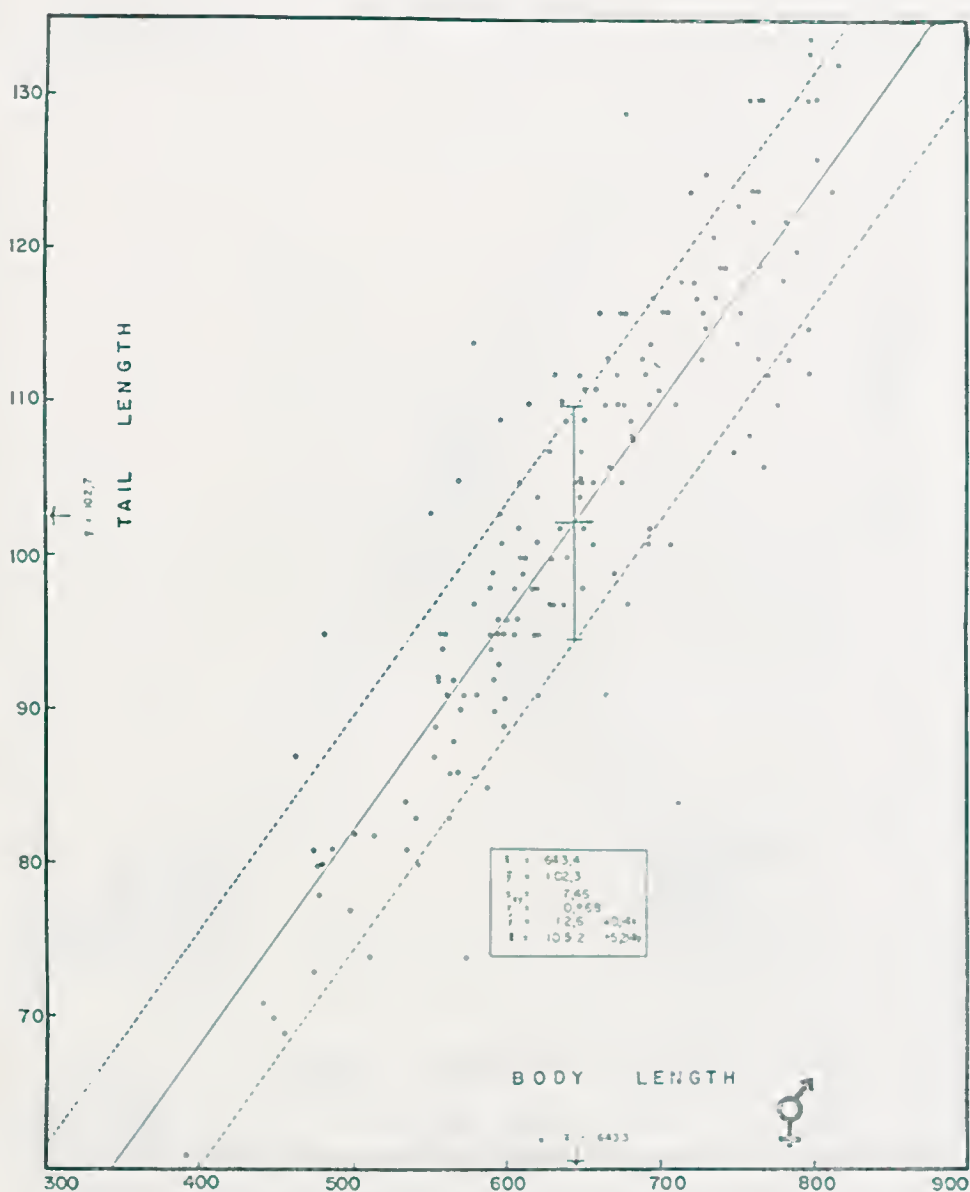



Fig. 11. Tail-body length regression line for all intersexes included in table I.

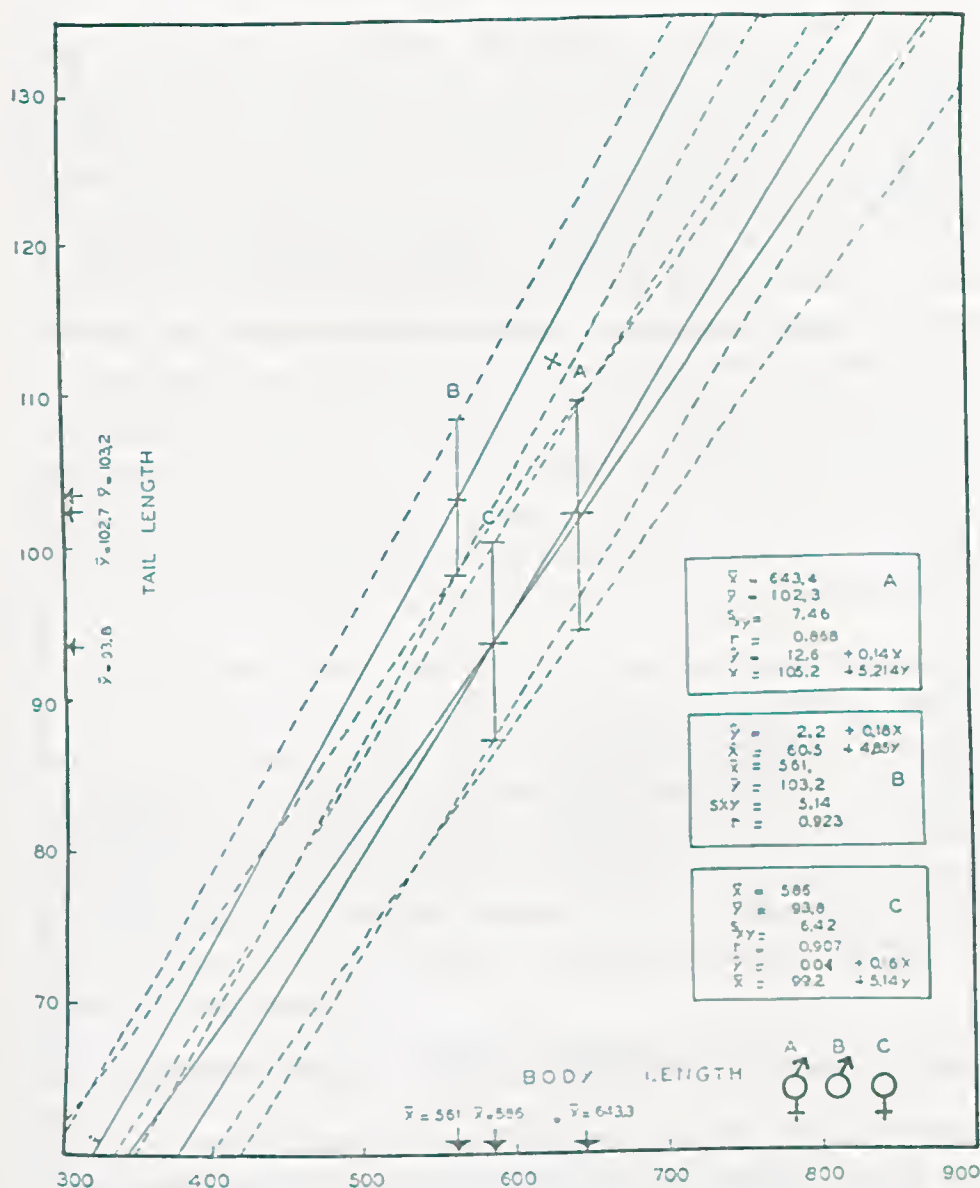



Fig. 12. Tail-body length regression lines for all males (curve B), intersexes (curve A) and females (Curce C) included in table I. The cross corresponds to hermaphrodite individual (snake 15843).

3 — *Regression: Body-Tail Length*

Figs. 9, 10, 11 give the data of the regression line between the length of the body and that of the tail. For the evaluation of this line the body length was taken and called "trunk" without the head, because the statistical data of the Instituto Butantan for "body length" include the head, and the head has a peculiar sexual variability.* These diagrams for males, females and intersexes were drawn together in fig. 12 which shows that, while the range of variation around the two regression lines presents considerable overlapping as regards females and intersexes, the range around the regression line for males is well separated from those of females and intersexes. All

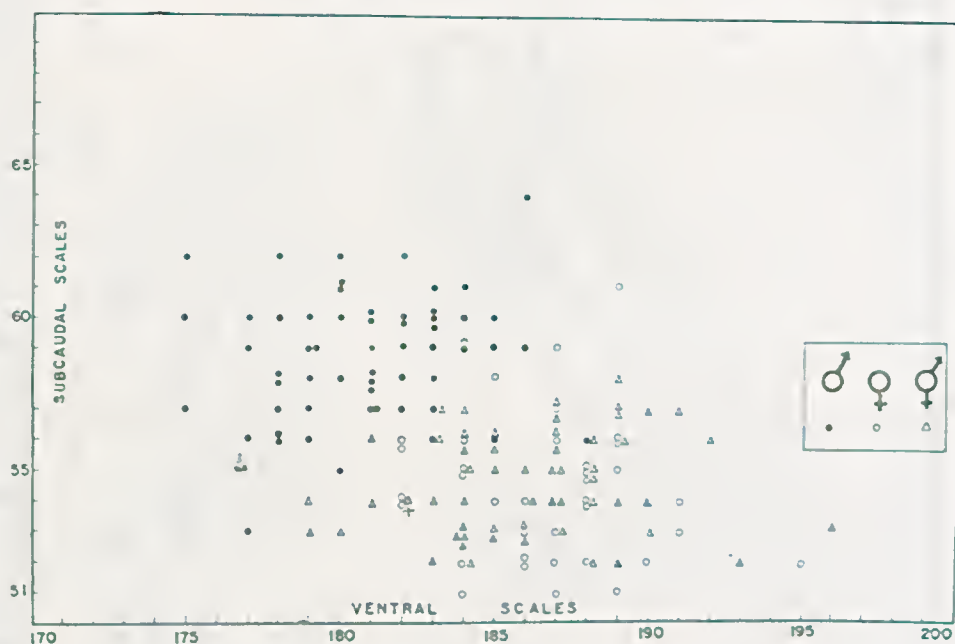



Fig. 12. Relationship between the number of ventral and subcaudal scales males, females and intersexes of the snakes included in table I. The cross corresponds to a hermaphrodite individual (snake 15843).

---

* The correlation coefficient "r" has been calculated for all sexes and intersexes, and was found to be close to 1. The standard error of estimate gives an indication for the variability of the regression.

these facts indicate that during the development the tail of the males grows more rapidly than in the case of females and intersexes; the opposite is verified for the growth of the body. The "relative growth" or heterogenic growth is thus a sexual variant, at least in *Bothrops insularis*, that gives the indication that the intersexes are females. We must remember that Wolff (77), as quoted on page 74, as well as Padoa (58) pointed out that the body size is a good "somatosexual character" maintaining its effect even after castration and hence being independent from any hormonal action.

4 — *Scatter Diagram (ventral and subcaudal scales)*

The analysis of the correlation between ventrals and subcaudals, made by Klauber in many species of snakes, gives an excellent criterion for sexual differentiation. Fig. 12 shows a sharp distinction between males, females and intersexes; the males have fewer ventrals and more subcaudals; the females and intersexes have more ventrals and fewer subcaudals. A small overlapping area exists which corresponds to those already considered for single characters.

Vade Fox (29) discussed the variation in scutellation from the taxonomic point of view and showed that this character may eventually vary with the ecological conditions acting during the embryological development. However, the sex differences in scale counting are specially good for the ventrals, maintained in spite of the influence of the temperature during the early embryological segmentation period. Vanzolini and Ferreira Brandão (74) studied the sexual differences in scaling in *Bothrops alternatus* captured at different localities. It appears that in different populations the sex differences are differently significative.

5 — *Statistical Treatment of the Data by Means of a "Discriminant Function"*

In order to give a sharper distinction between the three categories of sex (male, female and intersexes) we have applied the statistical method developed by Fisher (23) for the taxonomic distinction of groups differentiated by several quantitative characters, each of which contributes a certain amount of weigth to the differentiation of the taxonomic groups. For this purpose, a linear function of the measurements, called discriminant function, was thougth of, based on the principles that it would minimize the ratio of the

TABLE V

Data for the computation of a discriminant function relative to number of dorsal scales (X_1), *ventral scales* (X_2), and subcaudal scales (X_3).

	MALE	FEMALE	INTERSEX
N	151	37	176
SX_1	3778	938	4493
$\bar{x}_1$	24,5325	25,3513	25,5281
SX_2	27841	6909	32739
$\bar{x}_2$	180,8052	186,7297	186,0170
SX_3	8999	2014	9653
$\bar{x}_3$	58,4351	54,4324	54,8466
SX^2_1	92830	23800	
SX_2^2	5035782	1290101	
SX_3^2	526599	109832	
SX_1X_2	683044	175151	
SX_1X_3	220742	51056	
SX_2X_3	1627213	376036	
d_1		0,8189	
d_2		5,9245	
d_3		−4,0026	

(Notation similar to that of table IV)

TABLE VI

Sums of squares and products of three measurements, table IV, within male and female sexes, for length

	Head (X_1)	Body (X_2)	Tail (X_3)
Head (X_1)	2329,5509	45829,223	7790,8816
Body (X_2)..	—	1086598,96	177008,453
Tail (X_3)..	—	—	35549,886

TABLE VII

Sums of squares and products of three measurements, table V, within male and female sexes, for scale number

	Dorsal side (X_1)	Ventral side (X_2)	Subcaudal side (X_3)
Dorsal side (X_1)..	166,7702	−39,511	−27,2[illegible]
Ventral side (X_2)..	—	1727,451	109,3[illegible]
Subcaudal side X_3	—	—	94[illegible],9318

value is even beyond that for females. As pointed out also by Fisher, to each discriminant functiou an analysis of variance can be applied which shows the degree of reliability attached to its discriminative power. This is shown in table IX where the value of the probability corresponding to the F-test of each discriminant function specified in the first column is expressed in the last column. For comparision, the same table contains besides the discriminant function for length and scale numbers, each with three independent variables, the F-test for six other discriminant functions with only two or even one variable alone, obtained by similar processes with the appropriate data of table IV. Judging by the F-test, the least discriminative functions is that based on length of body alone, a conclusion which is in agreement with the information given in the last column of table VIII: on the other hand the

TABLE VIII

Discriminant functions with three independent variables

Discriminant function	Independent variable	Parameter ($x10^6$)	Standard error ($x10^6$)	Ratio parameter standard error
Relative to length	Head (X_1)	6708 (l_1)	808	8,3
	Body (X_2)	132 (l_2)	44	3,0
	Tail (X_3)	-2391 (l_3)	196	12,2
Relative to scale number	Dorsal side (X_1)	5078 (l_1)	1206	4,2
	Ventral side (X_2)	3832 (l_2)	375	10,2
	Subcaudal side (X_3)	-4523 (l_3)	507	8,9

The variable for body length (X_2) actually consists of head lenght (X_1) plus body length in narrow sense ($X_2 - X_1$).

TABLE IX

Significance tests for discriminant functions

Component independent variables	d. f.	Error variance	F	Probability level
Head length	1:189	21,35	22,743	< 0,01
Body length	1:189	3,82	4,083	> 0,05
Tail length	1:189	12,89	13,724	< 0,01
Head × Body (Length)	2:188	51,40	27,106	< 0,01
Body × Tail (Length)	2:188	156,30	82,398	< 0,01
Head × Tail (Length)	2:188	235,76	124,292	< 0,01
Head × Body × Tail (Length)	3.187	248,79	86,515	< 0,01
Dorsal × Ventral × Subcaudal (Scales)	3.187	240,46	83,617	< 0,01

d. f. = degrees of freedom

best one seems to be the dual discriminant function based on length of head and tail together, instead of three variable discriminant functions used at first; the *U-statistic* test of Rao (62) showed, however, no significant difference between both functions, which means again that the third variable body length, does not contribute significantly to the differentiation of snake sexes. (It can be proved that the *F*-test with one variable alone here used is equivalent to a *t*-test between male and female mean values of the involved variables).

TABLE X

Mean and standard deviation of each variable according to sex and capture sample, for length

Sex	Capture sample	Number of specimens	Head		Body		Tail		Discriminant function(*)
			Mean	S. D.	Mean	S. D.	Mean	S. D.	
Intersex	I	76	32,78	5,29	641,06	96,96	95,79	13,27	0,076
	II	100	35,90	4,42	703,64	84,97	107,93	14,06	0,076
Female	I	22	29,73	3,80	592,01	77,72	89,36	13,08	0,064
	II	15	32,99	4,49	653,67	95 71	100,40	15,61	0,068
Male	I	93	27,71	3,41	581,76	75,05	101,05	14,13	0,021
	II	61	28,41	3,08	600,00	66,03	106,33	11,62	0,016

(*) Discriminant function with three independent variables: head, body and tail length. Values computed with more decimals than those given for the mean sample variables.

TABLE XI

Mean and standard deviation of each variable according to sex and capture sample, for scale number

Sex	Capture sample	Number of specimens	Dorsal scales		Ventral scales		Subcaudal scales		Discriminant function(*)
			Mean	S. D.	Mean	S. D.	Mean	S. D.	
Intersex	I	76	25,47	0,85	185,98	3,46	54,59	2,37	0,595
	II	100	25,57	0,94	186,04	3,09	55,04	2,31	0,591
Female	I	22	25,36	0,79	186,23	2,72	51,18	2,15	0,597
	II	15	25,33	0,72	187,47	2,87	54,80	2,72	0,599
Male	I	93	24,55	1,00	180,57	3,09	58,32	2,37	0,553
	II	61	24,51	0,94	181,16	3,09	58,61	1,92	0,554

(*) Discriminant function with three independent variables: dorsal scales, ventral scales, and subcaudal scales. Values computed with more decimals than those given for the mean sample variables.

Table X gives the averages and standard deviations of head, body and tail lengths for intersex, male and female groups in each of the captures I or II, along with the value of the discriminant function with three variables for length; similar data are presented in table XI for scale numbers. Con-

firming previous statements, both tables show that intersexes and females seem to form a homogeneous group with values of their discriminant functions almost independent from the capture samples, but quite distinct from the corresponding values for males. The values for the respective discriminant functions for lengths and scale numbers were plotted in fig. 13.

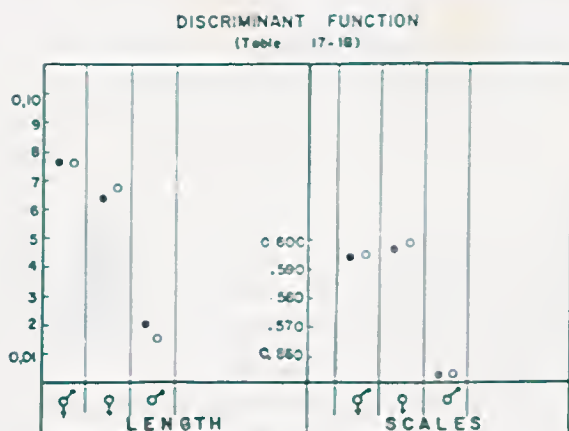



Fig. 13. Discriminant function for length and scale numbers for snakes collected between 1914-1920 (full circles) and between 1946-1953 (empty circles).

B — *Variation of the sex ratio in the population*

As stated in our introduction chapter, the specimens of *insularis* her studied have been captured in sucessive expeditions to "Queimada Grande" island and have been grouped in two distinct periods, separated by a gap of time of about 25 years. From the collected snakes 367 well prepared specimens have been selected for the statistical analysis. The snakes of the first group have been captured between 1914 and 1920, and those of the second group between 1946 and 1953. A third group of 81 individuals captured during 1954 and 1957 is not included in the data here published and will be the subject of a future paper. In the last captures special emphasis has been paid to the ecological distribution of the snakes in the different parts of the island, taking in account the frequency of the sexes in the different environments, but as far as we can infer from these captures no selective ecological difference exists between sexes or intersexes.

Figs. 14 and 15 show the percentage of sexes in the three groups captured. A decrease in the frequency of males and an increase of intersxes is evident. The frequency of the females appears almost invariable. The diffe-

rence between the males of the groups, as well as those of the intersexes, are statistically significant. The difference between the two groups of females is not significant. These facts show that a variation in the composition of the

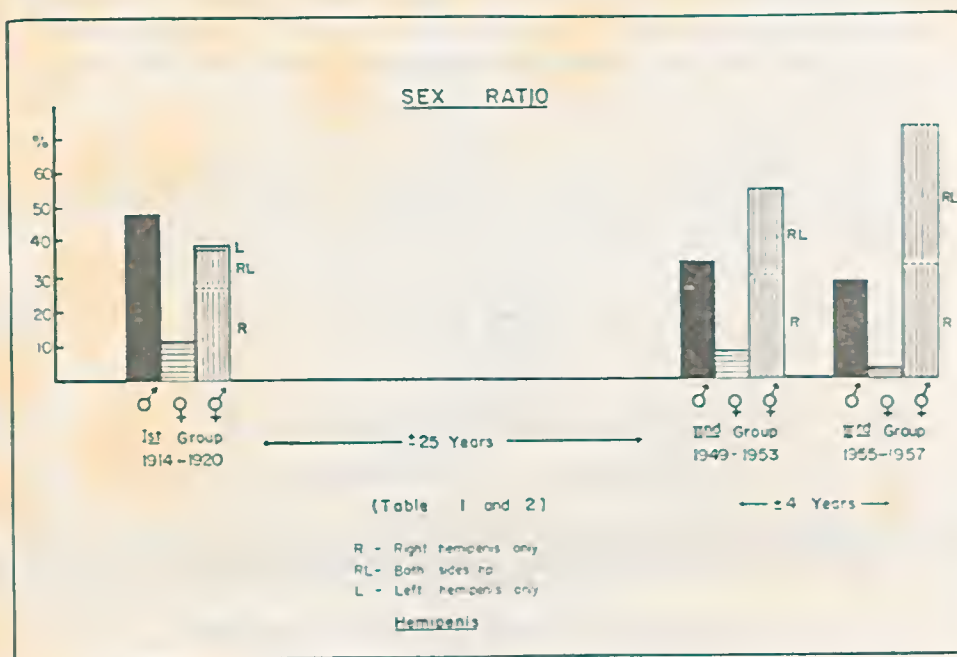



Fig. 14. Sex ratio in *Bothrops insularis* at different periods. The data of the third sample will be discussed in a future paper.

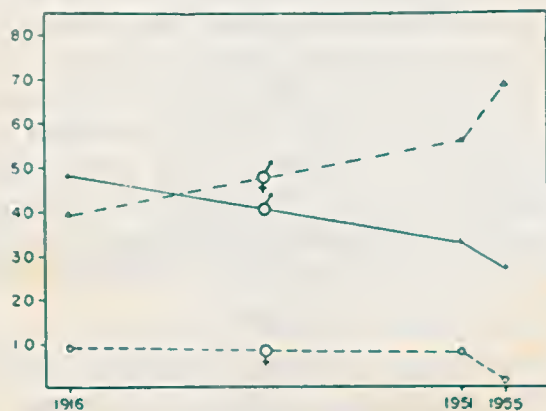



Fig. 15. Sex ratio in *Bothrops insularis* at different periods.

population from the sexual point of view is in action, and although far from being easy to interpret, are here considered very important.

If the intersexes were genetically males, their increased frequency and the corresponding decrease of males would be interpreted as an increase of the factors influencing intersexuality in the population during the 30 years. But this seems not to be the case because, with great probability, the intersexes are genetically females. We shall discuss further on the possibility, that some females could become intersexes after birth. This would be possible by both the statistical analysis of the somatosexual characters and the embryological observations.

A shift of the percentage of the sexes during the 30 years period would thus be determined by other factors. Our data on the sex ratio of the embryos of *Bothrops insularis* are not sufficient. As shown in the next chapter, in other species of snakes there is a rather good 1:1 sex ratio between the embryos borne by one female, or between groups of embryos of ovoviparous species. But, for the *insularis* embryos there is a great variability, and a good deal of fertilized eggs shows degenerescence. Even if we could have more data on this fact in the second and third groups of captures, these data would not have great interest for our problem because of the lack of information in this respect for the first group of captures. This group had been collected before the discovery of the abnormality, and no embryo was examined by the collector at that time. From the first group of captures we can infer that, if really the intersexes were genetically females, the sex ratio would be 1:1, that is the approximate ratio between the number of males and the sum of both true females and intersexes (Fig. 15). This is not true for the second group . If the first group really had the sex ratio as assumed above, we could present the facts as follows: some of the individuals genetically females have a factor that determine the appearence of the hemipenis. This factor does not interfere with the breeding capacity of these females, although perhaps there is a diminution in fertility, in comparison, for instance, with the *Bothrops jararaca*, common "jararaca", and with great probability there is some factor that inhibits the fertility in true females (those without the factores for hemipenis).

During the last 25 years the approximate ratio of 1:1 between the males and the sum of females and intersexes showed a decrease from the initial value of 1:1 in favour of the intersexes. It is possible that lethal factors eliminate a certain number of males during the first period of life. The increase in the

percentage of intersexes may perhaps be ascribed to the selective pressure of the ecological environment, to which the intersexes are better fitted. Secondly the increase in the percentage of intersexes may be the result of the high grade of inbreeding in the isolated population that results in the appearence of a higher number of recessive homozigotic phenotypes, and finally a third factor can be supposed: the increase of the rate of the eventual mutation that determines the intersexuality in the the population. For the present the problem has to be left at this stage. A further attempt to interpret these facts, in terms of population genetics based on some working hypothesis on the genetical factors of the abnormality, will be published in the future.

EMBRYOLOGICAL OBSERVATIONS IN THE GONADS

A — *Introduction and Technique*

Having captured some pregnant *Bothrops insularis*, it has been possible to study the development of the gonads of the embryos in order to inquire whether some disturbances on the relation between the ambisexual parts of hystological constitution of the embryonal gonad are related to the presence of the hemipenis. In all Ophidia it is possible to regognize easily the sex of the embryos by the hemipenis everted during the whole period of development. In other species of snakes (*Bothrops jararaca*, *Crotalus*, *Xenodon*, etc...), as we have already stated, the sex ratio is always 1:1, one half of the embryos with, and the other half withouth, hemipenis. The histological constitution of the gonads always confirms the sex as determined by the hemipenis. In *Bothrops insularis*, however, the presence of hemipenis is insufficient to indicate the sex of the animal examined. In fact, of all the embryos studied, only one was completely deprived of this organ and all the others presented a more or less developed hemipenis on both sides or on the rigth side only (Figs. 16, 17 and 18). The degree of development of the hemipenis was conventionally indicated by three stages (+++) (++) and (+) as shown in Table XII and in Fig. 18. We shall return to this argument further on.

All pregnant mothers were intersexes and, as we have already stated, no true females have ever been encountered in a pregnant state. The development of the gonads and their anomalies have been studied specially by Forbes (24-28) in alligators and Risley (63-66) in Chelonia. In Chelonia there exists in the testicles of the embryos a transitory cortex, in alligators the transitory cortex persists in the testicles and a medullary zone persists longer in the juvenile ovaries. The only case of intersexuality in adult Reptilians has been

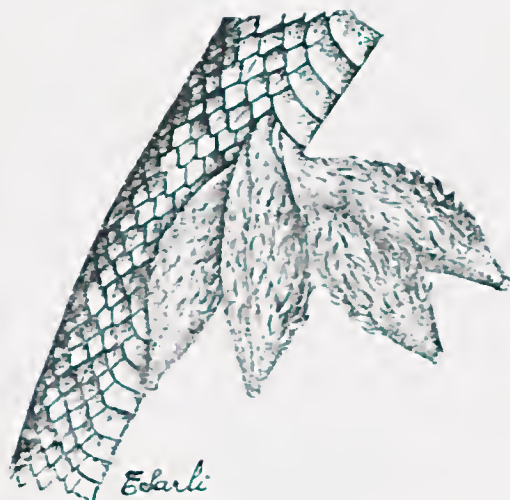



Fig. 16 — Male *Bothrops insularis* with the hemipenis njected wth paraffin.

Fig. 17 — Ventral view of a dissected *Bothrops insularis* showing oviduct, cloa a and hemipenis at both sides.

described by Matthey (57) in the turtle *Emys europea*, in which an ovary existed on one side and an ovotestis on the other.

Experimental intersexuality has been obtained by Dantchakoff (15-18) in Lacerta, by Forbes (24-28) in Alligator, by Kehl (41-44) in various lacertids, and by Risley (63-66) in turtles. By treating the embryos in a later period of development in which the gonads were sexually determined, the last author obtained only the stimulation of the copulatory organs towards

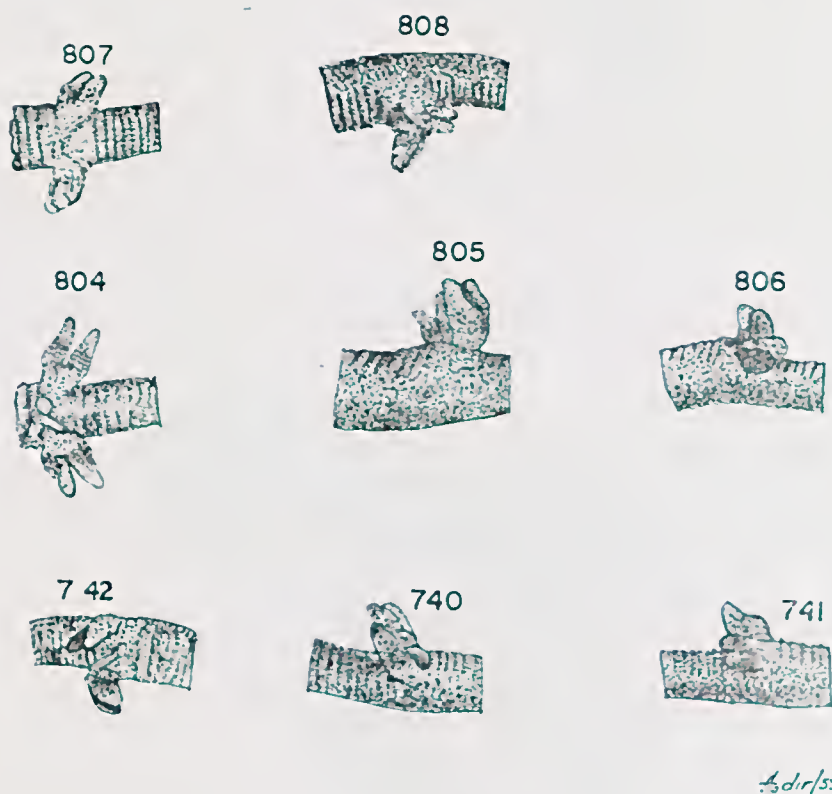



Fig. 18 — Different types of hemipenis presented by embryos of *Bothrops insularis*. The figures correspond to the embryos included in table XII

the male sex, although the gonads do not respond to the hormonal stimulation towards an inversion to the originary sex. Nothing is known in this respect about Ophidia.

Summing up, it is evident that in reptile embryos, the gonads retain their bipotentiality through a period rather advanced of their development, and the ovaries retain the medulla longer than the testicles retain cortex.

B — *Description of the Embryonal Gonads in Bothrops insularis and other Snakes.*

The following embryos have been studied: (Tables XIII and XIV).

TABLE XIII

Fully developed embryos of *Bothrops insularis* studied histologically

Mothers	Embryos	Sex		Sex	
	Slide number	Embryo identification	Sex*	Degree of hemipeni ** development	Observations
Intersex n.º 15115 IB	740	a	male	++	Cortex traces in testicles
Embryos of 130mm	741	b	male	+	
	742	c	male	[illegible]	Total absence of hemipenis
	733	d	female	—	
6 males — 1 female	806	e	male	+	
	808	f	male	++	
	807	g	male	++	
	732	h	—	+	Histological lost material
Intersex n.º 15111 IB	727	a	male	+++	Only right hemipenis present
	731	b	female	+	
3 males — 2 intersexes	801	c	male	+++	
	805	d	male	++	Only left hemipenis present
	728	e	female	+	

* Sex — as determined histologically.

** See text.

TABLE XIII

Early embryos of *Bothrops insularis* studied histologically

Species	N.° I. B. mother	Embryos n.° mm.	Prep n.°	Observations
B. insularis...	15.860	35–40 35–40 35–40	763 769 770	Germinative epithelium Without gonocytes
B. insularis	15.868	60–70 60–70	773 872	Gonocytes Both in cortex and marrow
B. jararaca	15.862	70	774	Gonocytes

TABLE XIV

Embryos from other species and new-born snakes Studied histologically

Species	mm.	Sex hystological N.° preparation	Observations
Xenodon merremii	99	386 male	Cortex traces in testicles – Gonocytes in cortex and marrow
Xenodon merremii	180 180	730 male 729	Testicles well differentiated Ovocytes in lepto and pakitene
Crotalus d. terrificus	newborn	832 male 837 female	Gonads sexually well differentiated.
Bothrops alternatus. .	24 hours after the birth	848 male 854 female 850 female	Gonads sexually well differentiated Ovocytes in lepto and pakitene

Bothrops insulariss embryos of 35-40 mm.
Bothrops insularis: embryos of 60-70 mm.
Bothrops insularis: embryos of 130 mm.
Bothrops insularis: embryos of 160 mm.
Bothrops jararaca: embryos of 70 mm.
Bothrops alternatus: embrios of 24 hours (neworn)

Crotalus durissus terrificus: embryos of 24 hours (newborn).

Xenodon merremii: embryos of 99 mm.

Xenodon merremii: embryos of 180 mm. (almost at hatching).

All the embryos have been transversally sectioned in four segments of equal length, indicated as A, B, C, starting from the cloacal region in caudo-cranial direction. The embryos of 35 to 70 mm were arranged with all consecutive segments paralleling each other in the same paraffin block and sectioned together. This method facilitates the reconstruction and the immediate identification of the gonads. More advanced embryos and newborns have been dissected and the gonads and kidney fixed separately. All embryos have been fixed in Bouin fluid, stained with Harris or Haidenhain hematoxilin and eosin. Some sections have been stained with trichromic Mallory or with Feulgen.

In the younger embryos (35 mm) the gonadal ridge is very long and in the transverse section it appears on both sides. In older embryos there is an asymetry as in the adults, and the rigth gonad is more cranial than the left one. For this reason in the older *insularis* embryos of 130-170 mm the gonad is present only at one side of a section.

We shall briefly describe here the situation of the gonads of the embryos in an age sequence.

I — Embryos of *Bothrops insularis* of 35-40 mm from the pregnant intersex n.º 15.860. The embryonated eggs have been opened and the embryos fixed as soon as the amniotic cavity was open. The embryos have been stretched on a Petri dish, measured and fixed. They were then sectioned in the A, B, C and D segments as previously described.

Plate 7 A (embryo 763 and 769) (35-40 mm) shows a transversal section of this stage. The genital ridge on both sides of the mesentery is constituted by one layer of epithelium with some rare primary gonocytes distinguished by their larger size. The interrenal medullar blastem is clearly distinguished also by bearing some rare gonocytes.* The gonads in this stage are thus completely undifferentiated. The mullerian duct is clearly visible as a little groove on the external and dorsal side of the coelomatic epithelium.

---

* Dorsally, this medullar blastem of the interrenals is clearly visible and in some section it is in direct continuity with the medulla of the gonads. These interrenal blastems are well defined and completely independent from the mesonephric tissue.

These observations show a histogenetic identity of the gonadic medulla and the interrenal blastem as shown by Vannini (72-73) in Amphibians, Birds and Mammalians and by Chieffi in Selachians (9). We shall emphasize here these observations that complete the picture of the identity of origin of the two tissues (interrenal and medullar of the gonads) in the Ophidia.

Plate 7

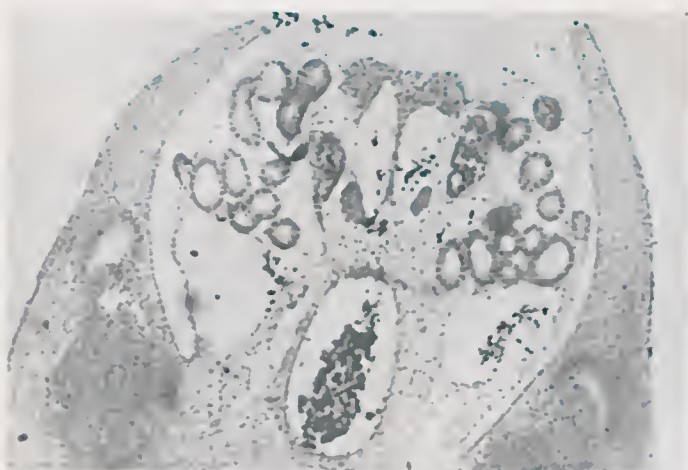



Fig. A

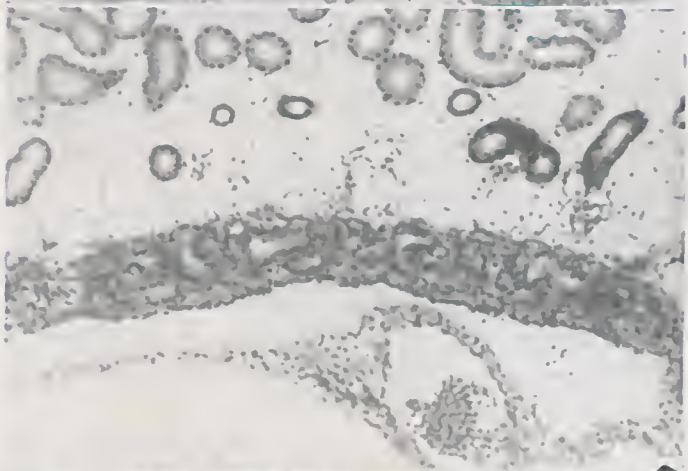



Fig. B

Fig. C

Plate 8

Fig. D

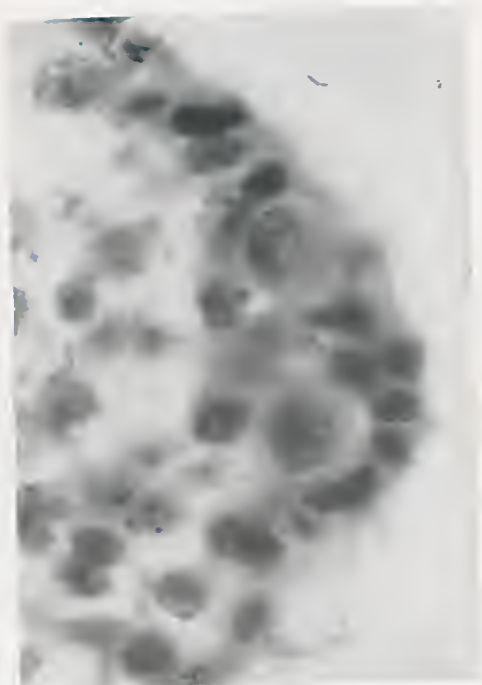



Fig. F

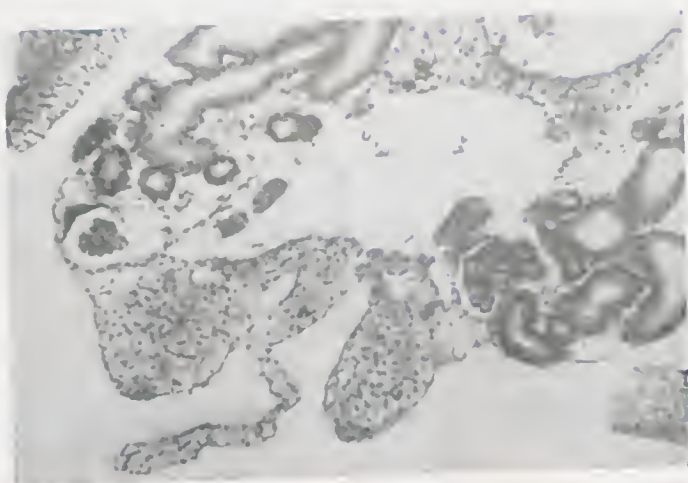



Fig. E

Plate 9

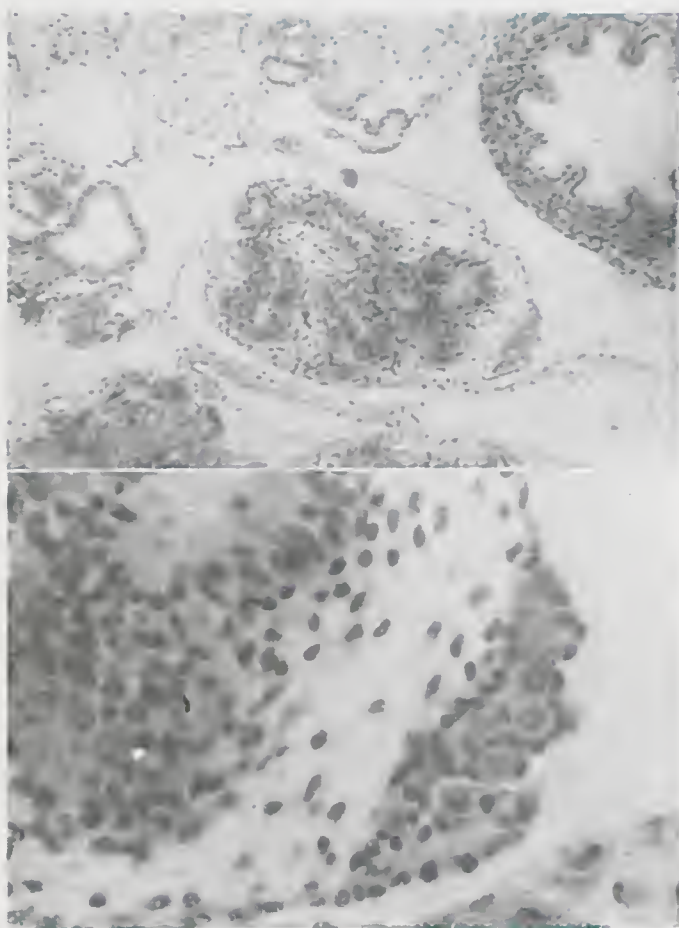



Fig. G

Fig. H

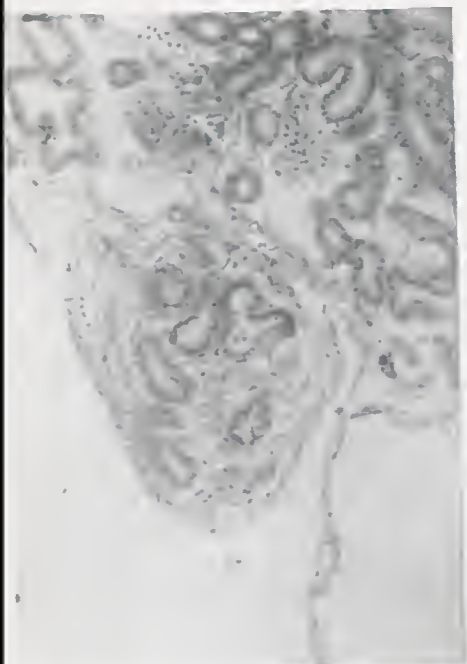



Fig. I

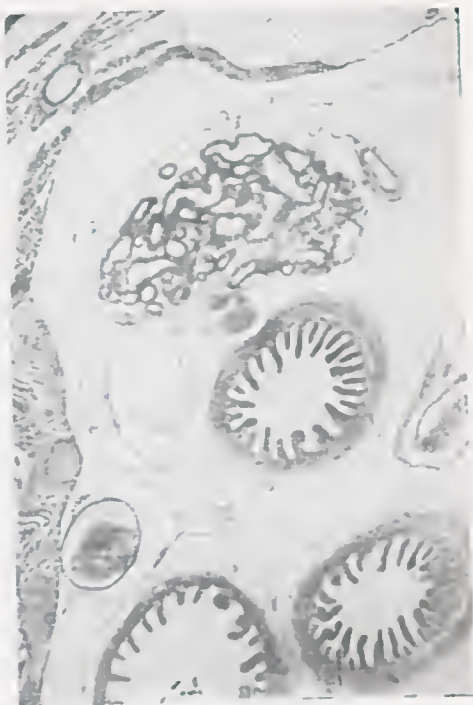



Fig. J

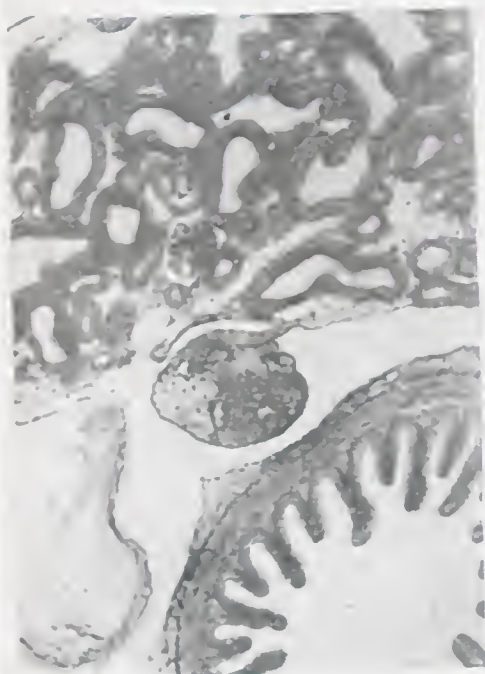



Fig. L

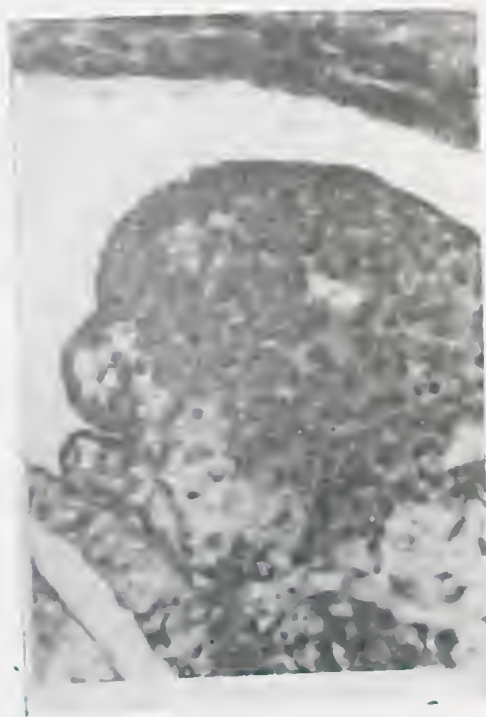



Fig. M

The same situation is shown in another embryo (n.° 769) (35-40 mm) in which some mitotic figures are shown by the gonocytes. The embryos n.° 770, (plate 7B and C) of the same age (35-40 mm) as the preceding ones, was sectioned frontally longitudinally and shows the gonadic area in which the medullar is disposed in cords, and rare gonocytes are equally distributed in both cortex and medulla.

2 — *Bothrops insularis* of 60-70 mm., n.° 773, plate 8 D, E, F from the intersexual mother n.° 15.868. The gonadic area is more proeminent into the coelomic cavity. There are more gonocytes, the cortex is more developed than the medulla, and pluristratified, and it seems richer in gonocytes than the medullar region. The embryo n.° 872 of the same age (60-70 mm) seems to have more gonocytes in the medulla than in the cortex. The müllerian ducts are clearly visible on both sides.

3 — *Bothrops jararaca* embryo of 70 mm. This is at the same stage of development of the gonads as the embryos n.° 773 and 872 of *insularis*.

4 — *Xenodon merremii* Embryo of 90 mm. This embryo has been fixed from an egg when more or less one month old, having been layed on moist sand by a female; this happened at the "Ezequiel Dias Institute", Belo Horizonte, Brazil. The section at the region "D", that is rather cranial, presents two gonads with a distinct testicular structure. Medulla with tubular structure, with many gonocytes. At the cranial region of the testicle the interrenal blastem is visible caudally. This testicle presents a rather prominent region of cortex bearing some gonocytes. (Plate 9 G-H). At this stage, therefore in *Xenodon*, the gonad is well differentiated, although with a residual feminine cortex, as encountered in other Reptiles mentioned before. This embryo must have been at approximately one third of its developmental period.

5 — *Bothrops insularis* 130 mm. These embryos are at a rather advanced (Plate 10 I-J-L-M) stage of pregnancy. Although it is not possible to determine the date, we think it must have been close to eclosion. The two pregnant intersexes n.° 15.115 and 15.111 were captured by the same expedition and killed at the same time. The embryos of n.° 15.115 were at a less advanced stage than those of n.° 15.111. The hemipenis is perfectly recognizable, and Fig. 19 shows the post-cloacal segment in each different stage of development of the copulatory organ.

All embryos of this lot have been prepared according to the scheme indicated before and the gonads were generally situated at segment D, a few partly at segments C or E.

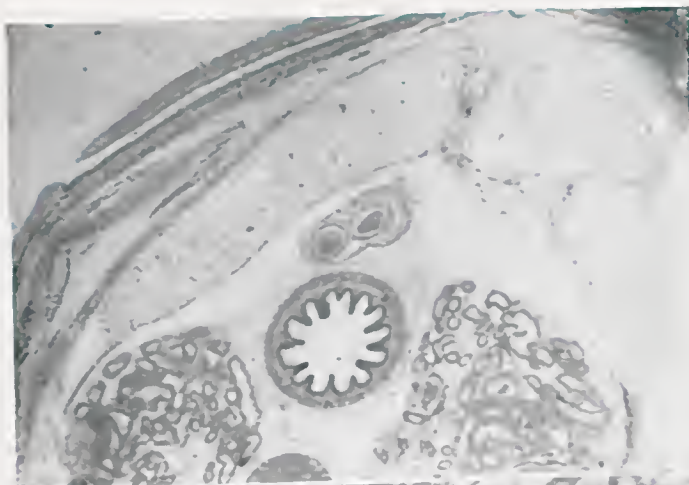



Plate 11

Fig. N

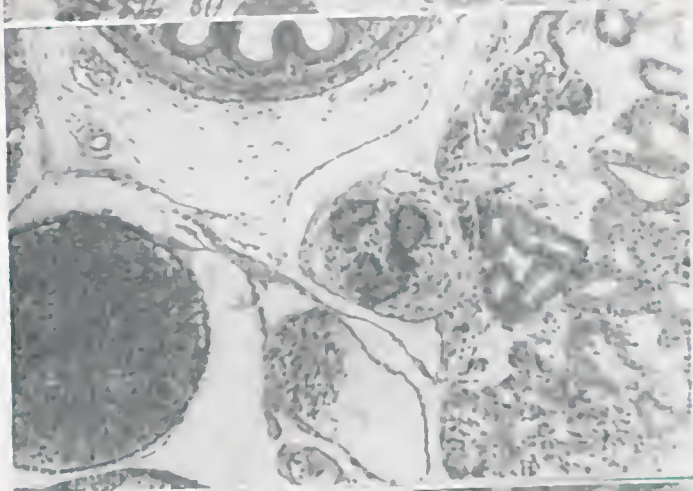



Fig. O

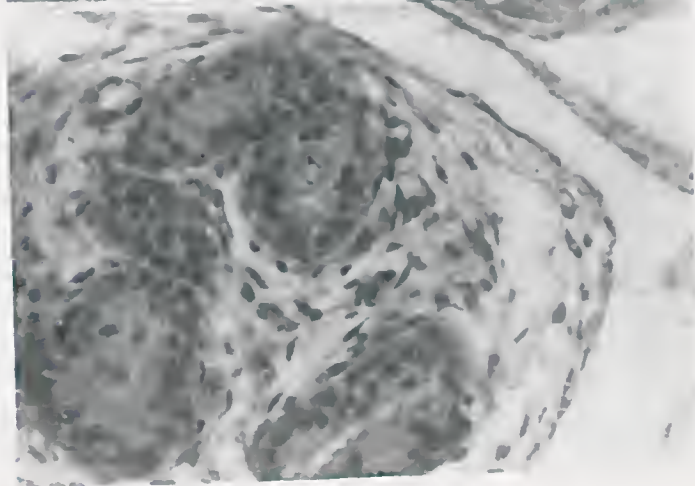



Fig. P

Plate 12

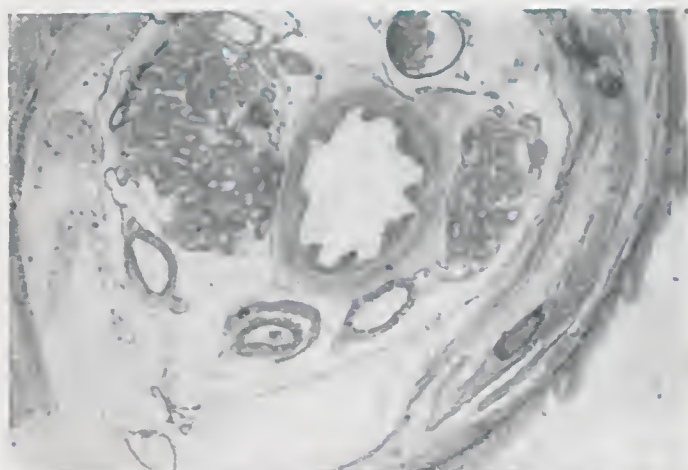



Fig. Q

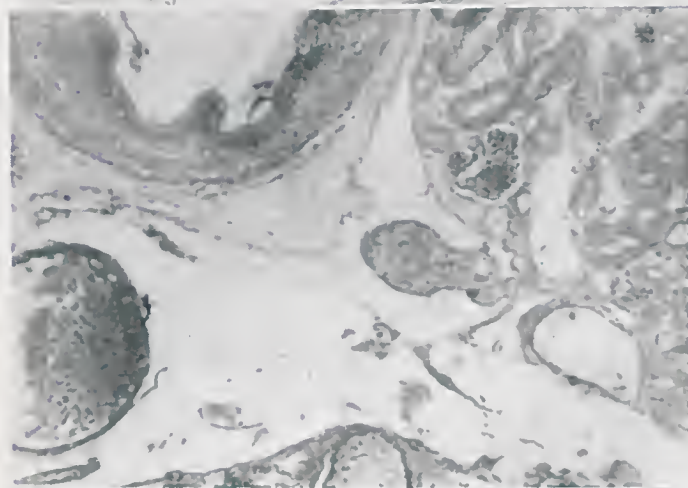



Fig. R

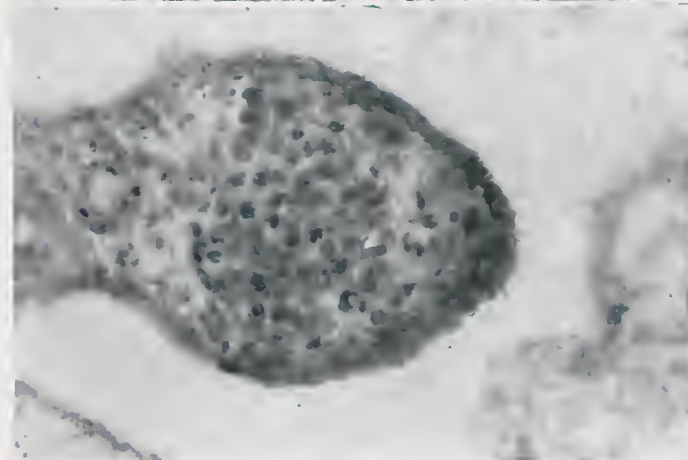



Fig. S

Embryos n.º 740 (mother 15.115) "a". The gonads have the structure of a well differentiated testicle, and lack mulleriam ducts. Cortical epithelium is monolayer and lacks gonocytes. Only at the cranial region of the left testicle there is a little cortical zone with pluristratifield epithelium limited to a few sections and without any gonocytes. Like the epithelium, medulla tubule actively proliferating but with few gonocytes. (Plate 10 I).

Embryo n.º 741 "b, c", same mother as the precedent. This one, as well as embryo n.º 742 "e", has the same testicular structure as n.º 740. Rare gonocytes and no mullerian duct.

Embryo n.º 733 "d", the gonad is typically feminine, connected with the mesonephros by a peritoneal peduncle (plate 10 J). Cortex pluristratified, with gonocytes. Medullar cords solid, well separated from the cortex by a connective layer. Sometimes, the cords show a tubular structure clearly evident in longitudinal section (plate 10 L). Gonocytes distinctly localized in the cortex, although some rare ones are spread into the cavity of the medullar cords. The gonocytes of the cortex have a well differentiated layer of follicular cells. Mullerian ducts well developed (plate 10 M). This embryo was the only one showing lack of hemipenial structure.

Embryos n.º 806 "c", *n.º 807 and 808*. All with testicular gonads as n.º 741 and 742. Strong proliferation of the medullar canals, but with few gonocytes. Some gonocytes spread into the extra medullar conjunctive tissue, near to the epithelium of the coelomatic cavity. Mullerian ducts totally lacking. In all these embryos the interrenal presented zone of epithelial cords dorsally and laterally to the mesonephros and in some sections there are isles of paragangliar tissue.

6 — *Embryos of the intersexual mother* n.º 15.111 — 160 mm.

Embryo n.º 727 "a". This is the embryo with the most developed hemipenis. Testicles well evident, but not more developed than those of the embryos from mother n.º 15.115. The tubullar structure of the medulla is perhaps more clearly defined. Few gonocytes. Absence of mullerian ducts (plate 11-N-O-P).

Embryo n.º 728 "e". Hemipenis only on left side. Ovary with pluristratified cortex at the central region. At the sides the epithelium is monostratified. Rare gonocytes in the cortex and in the conjunctive tissue, but not in the medullar cords. Longitudinal section as in the embryo n.º 733. (Plate 12 Q-R-S). Müllerian ducts well developed.

Embryo n.º 731 "b". Hemipenis only on rigth side, not well developed. Gonads with feminine structure, with pluristratified cortex well separated by

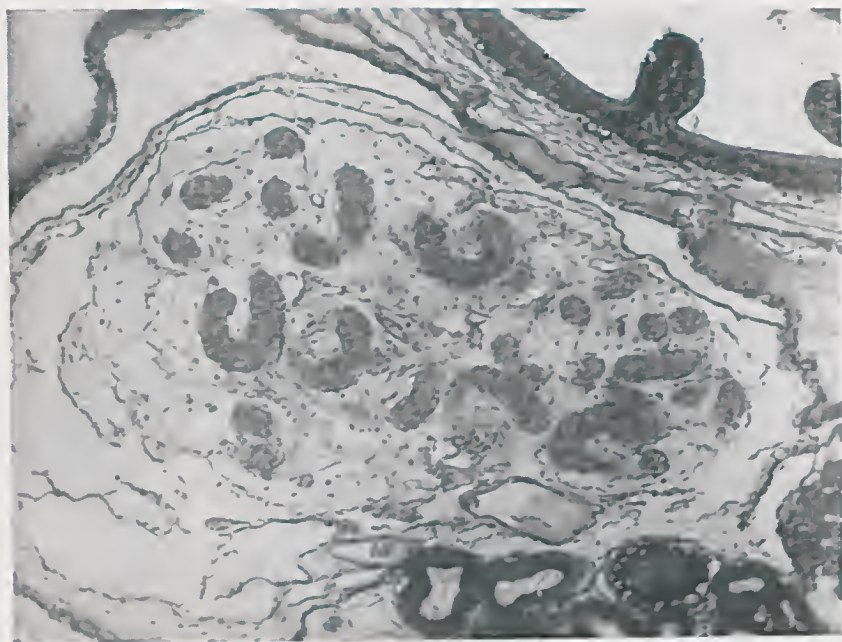



Plate 13

Fig. T

Fig. U

Plate 14

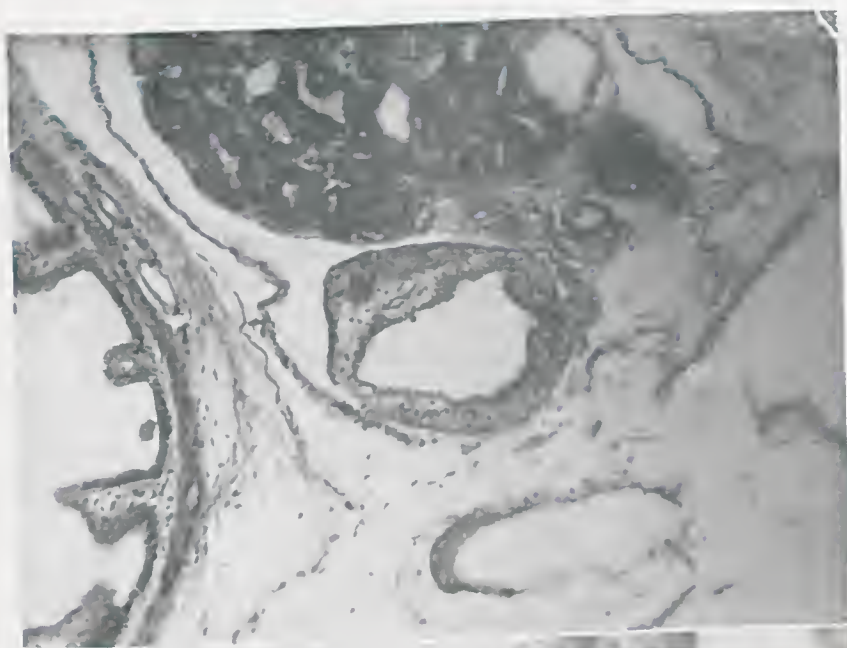



Fig V

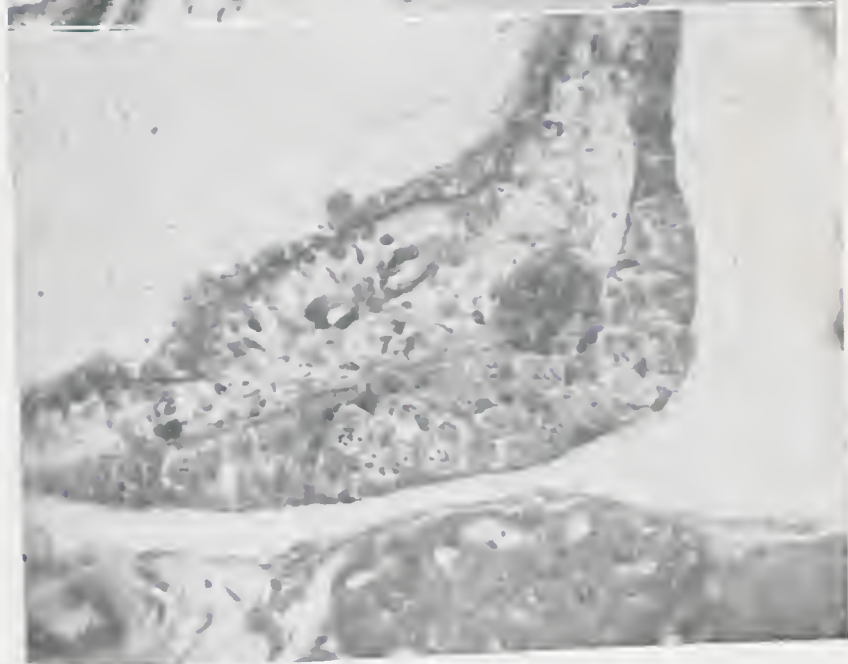



Fig W

a layer of conjunctive tissue from the non-tubular medullar cords. Rare gonocytes in the cortex as well as in the medullar cords. Two well developed mullerian ducts.

Embryos n.º 804 and 805. Testicles with the tubular structure of the medulla with rare gonocytes. No mullerian ducts. Hemipenis well developed on both sides.

7 — Embryo of *Xenodon merremii* of 180 mm.

Embryo n.º 729 (with well developed hemipenis) (plate 13 T-U). Testicles well developed, with solid medullar cords isolated in the middle of a loose conjunctive. Gonocytes frequently with mitotic stages. No vestiges of the cortex.

Embryo n.º 730 (without hemipenis). Ovary well developed with a great central cavity surrounded by endothelium. Cortex pluristratified thicker at the ventral region, with many gonocytes at the lepto and pachitene stages (plate 14 V-W). It is to be noted that the ovary at this stage is more precocius than the testicles in which no gonocyte appear to have begun the meiotic evolution.

8 — *Embryos of Crotalus durissus terrificus* (24 hours after birth). One male and one female embryos of this lot have been dissected and the gonads fixed together with the kidney.

Newborn n.º 832 (male. Testicles well differentiated, bound to the kidney. Medullar cords without lumen, with few gonocytes in mitotic proliferation.

Newborn n.º 837 (female). Ovary sac-like with the endothelium of the cavity folded. Cortex only at the ventral side with few gonocytes.

9 — *Embryos of Bothrops alternatus* (24 hours after birth). Gonads fixed separately as indicated for *Crotalus*.

Newborn n.º 848 (male). Testicle with solid cords rich in gonocytes arresting stage.

Newborn n.º 854 (female). Ovary sac-like with cavity endotelium folded. Cortex limited to inner shide proximal to the kidney. Many gonocytes with different nuclear sizes. Leptothene well evident.

Newborn n.º 865 (female) Like preceding one.

Newborn n.º 859 (male). Testicles very large. Medullary cords solid, but rich in gonocytes of variable size, some of them in mitosis.

Note — The numbers 15.111 and 15.115 refer to the enumeration used in the Collection of the Instituto Butantan. The number 763 and those following refer to the hystological preparation at the Institute of Biology at Belo Horizonte.

C — *Discussion of the embryological researches*

Summing up what we have observed in the embryos it is possible to come to the following conclusions:

1 — In the embryos of 30-70 mm of *insularis*, as well as of "jararaca", probably during the first half of the pregnancy the gonads are not sexually differentiated and localization of the gonocytes in the genetical ridge is already at the beginning. At this phase it is interesting to note that the medullar tissue is still connected with the interrenal blastem.

2 — In the embryos of *Xenodon*, probably during the first half of the pregnancy period, the gonads are sexually differentiated but the testicles retain an evident remain of cortex, as the ovaries retain a noteworthy portion of the medulla, both sexes bearing gonocytes in both parts of the gonad.

3 — In the embryos of *insularis* of 130 mm., probably no far from the birth, the sex is perfectly differentiated. The differentiation of the ovaries is slightly delayed, retaining a medulla as the solid cord stage; the central cavity of the ovary is not yet opened. The testicles are well constituted still at the solid stage of the medullar cords. Only one testicle was found retaining a residue of cortex at one apex.

4 — In newborn snakes, as observed in *Xenodon merremii*, *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops alternatus*, the gonads are perfectly differentiated from the histological point of view full of gonocytes, and the ovaries have gonocytes at the beginning of the meiotic prophase, while the testicles bear gonocytes still in mitosis.

Although this series of stages has not been fashioned with a unique species of snakes, the seriation appears to be quite complete. No newborn of *insularis* has been sacrificed for histological researches, because of the hope to raise them to maturity or to some crossings with related species of *Bothrops*. Unfortunately, they usually died shortly after birth and no good material for histological work could be preserved. The observation seems to confirms Risley's statement that some residue of the blastem of the opposite sex is retained in the full differentiated gonads in both sexes, but that the ovary is, in general, provided with medullar blastem for longer time. At birth, however, it seems that the ovary is ready to intiate meiosis before the testicles.

The embryological researches in the problem of the intersexuality of *insularis* are thus clearly indicating that the individuals bearing hemipenis on one side only are histologically females, while some embryos with a poorly developed but bilateral hemipenis, were definitely males. The sole individual completely deprived of a hemipenis, was definitely female. The intersexes are

not only females from the point of view of histology of the ovary, but bear two well differentiated mullerian ducts that never exist in embryos with testicles.

We cannot, at present, deny that the residue of cortex which can be found in some embryos could subsequently develop into an ovarian cortex, and the medulla degenerate, thus giving a true sex inversion. It seems that this fact can really be accomplished in some Reptilians by hormone treatment in the embryonal stage. Nothing is known about this possibility in snakes nor does it appear to be possible in other reptiles in a more advanced period of development of the gonads (Risley). The fact that only the cloacal region is sensitive to hormone treatment in this later period seems to be interesting for the case of the *insularis*, in which the only masculine character of the intersexes is precisely the development of a hemipenis at the sexual sensitive region of the clcaca.

The statistical analysis shows the feminine nature of the intersexes, and we discussed the genetical value of the somatosexual characters of the pholidosis. However, we must not forget that the statistical analysis shows also an overlapping of the dispersion field of all the sexes and intersexes. We cannot deny, due to this fact, that some males with the pholidotic characters more feminine, and thus genetically not so strong males, could eventually during the development invert the gonadic constitution with an overgrowing of the cortical residuals (see discussion for the diminution of snakes and increasse of intersexes). The same can be said of some genetical females, more deviated towards maleness from the statistical point of view in which the medullar region of the gonads or part of the adrenal tissue could eventually take an advantage and at least influence the inversion of the cloacal territory into a hemipenis (even in the embryonic period). This is all theoretical speculation that we must consider as a possibility, according to the data at our disposal. We shall discuss later the problem of the nomenclature of the sexual abnormalitics of *insularis*, but we can state here that it is not an easy task, and at present the term "intersexuality", specially in the broad sense of the classification of E. Padoa (58), is still the best to be used.

5 — *A case of true hermaphroditism.*

During the visit to "Queimada Grande" island from november 24 to december 3, 1953, one specimen of *Bothrops insularis* was found that presented a special interest and is here discussed in more detail. This snake (Instituto Butantan, n.º 15.843), dissected in december 15, 1953, presented both rigth and left hemipenis well developed, and normal left and rigth ovaries, but at the left side there was a testicle of about normal size. The cloaca received on the dight side the mullerian duct as a normal oviduct. On the

Plate 15

Fig. X

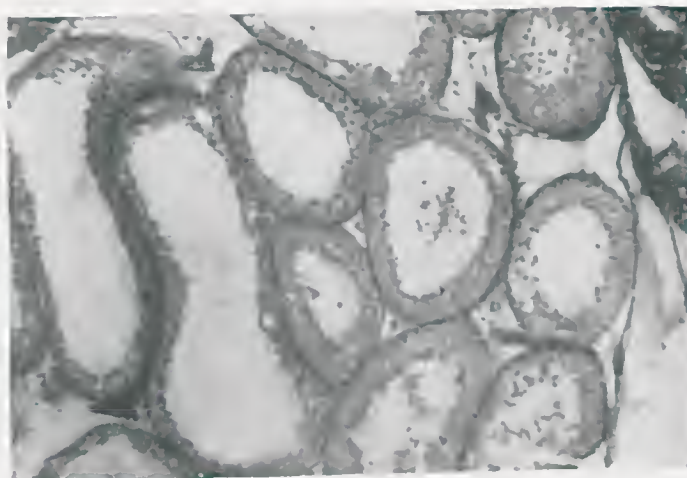
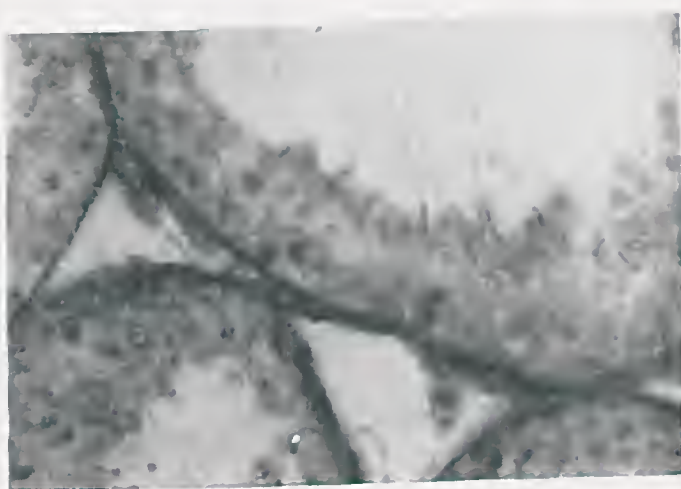



Fig. Z

Fig. Z a

left side both an oviduct and a Wollfian duct reached the cloaca. Smears of the contents of the cloaca, and also of the surface of sections of testicles made during the dissection, showed the presence of mature spermatozoids. The histological analysis of this testicles, fixed in Bouin, showed that it was at the end of the breeding season, just as testicles of normal *insularis* and *Bothrops jararaca* males, fixed at the same time for control.

At the end of the breeding season, only few spermatogonia are found on the periphery of the cross section of spermatic tubules. Spermatocytes and spermatides, of various stages, some of them more or less pycnotic and without any meiotic division, are found at this stage. In the lumen of the canalicles clumps of ripe spermatozoids are found, as well as spermatozoids attached to the Sertolian cells (plate 15 Z-Za) From this picture we can infer that with great probability the testicle of this snake was functioning normally.

We must remind here of a special feature of the spermatogenesis of snakes described previously by Schreiber (67) that was evident in these specimens. Plate (15 x) show the smear of the spermatozoid stained with Giemsa and Hematoxylin-eosin. Among the normal spermatozoids there exists a few larger ones although perfectly normal in shape, and more susceptible to staining.

A statistical analysis of the lenght of the spermatozoid heads shows that the giant ones belong to a separate size class. There are more or less 3.8% of, these giant spermatozoids (461 measured). We are not giving a special emphasis to this spermatozoid "dimegaly" because it has been found also in other species of snakes such as *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops insularis*, *Bothrops atrox*, *Xenodon merremii*, *Tomodon dorsatus*, *Oxyrhopus trigeminus* and *Erythrolamprus aesculapii* by Schreiber (67). Until new similar instances appear, no excessive importance should be given to this case. Such cases of hermaphroditism are known in many other vertebrates, in which a part of the ovary develops into a testicle by a predominance of medullary cords, thus, an ovotestis or separate testicles, being formed. The other intersexes of *insularis* never appear to bear testicles and the only disturbance in the phenotypic sex is a far greater incidence of the hemipenis in the population than any other sex abnormality in other animals.

The case of n.º 15.843 is quite different from the others that have been described now in *insularis*, because of the simultaneous presence of ovaries and testicles. This snake is situated in a strange position on the diagrams. As for the ventral scales, it is close to the male group, but as for the subcaudals it is more feminine. Nevertheless, for the tail length this snake is definitely more masculine in the histogram (Figs. 12 and 13).

We cannot classify clearly this case as one of gynandromorphism, owing to the fact that although a testicle was present on one side only, the ovaries and hemipenis are on both sides. It is clear that the case is one of hermaphroditism, but we cannot say whether it was "sufficient", that is whether the spermatozoids of the same snakes were the ones present in the cloaca, owing to the fact that in snakes the spermatozoids found in the cloaca a long time after copulation. We must wait for more cases of this type, and leave this one as an open problem. The evolutionary side of the problem will be discussed later. We must remember the case of the pig in the New Hebrids islands described by Baker (4, 5). This author found a great variety of "sex intergrade" in pigs both in England and in New Hebrids. There are different cases of intersexes in pigs. Some are true hermaphrodites in which an ovary is present on one side with an ovotestis on the other. In the case of the *Sus papuensis*, however, the fact is somewhat different. All the intersexes bear testicles only (in different degrees of atrophy) but they have the external female genitals, although always lacking vestiges of uterus, vagina or ovaries. This case is closer to that of *insularis*, with the difference of the genetic sex of the intersexes (males in pig and females in *insularis*). Only the anatomy of the external genitals is concerned in both cases. The difference between *Sus papuensis* and *Bothrops insularis*, however, is that the intersexes of the snake are functionally fertile females, while in the pig there is an atrophy of the testicle and the intersexes are sterils.

The high frequency of the intersexes of *Sus papuensis* together with the fact the the abnormality is localized in an insular population could lead to a comparision with the Queimada Grande snake. But we must remember also that the high frequency of pig intersexes is maintained on the island by a careful breeding of intersexes producing by the natives for religious traditions. We cannot ascertain whether natural selection or genentic factors are responsible for the high frequency of intersexes in the case of *insularis* because the population lives in entirely natural conditions.

6 — *Caryometric Researches for Ploidy Disturbances*

As in *Drosophila* an intersexual condition has been found in triploid vertebrate individuals (20-21). Triploid larvas of *Rana pipiens* as well as triploid newts suffer a transformation of the female gonad into a testicle during the development. The triploid genome alters the equilibrium among the sex factors and shifts the development of the gonads towards maleness. The criterion for detecting poliploidy used by Fankhauser (20-21) has been the nuclear size and the number of nucleoili in the somatic tissue. We tried the same criterion in *Bothrops insularis* in an attempt to see whether intersexes could eventually be related to a disturbance in ploidy.

The nuclear sizes of liver cells of males, true femailes and intersexes have been measured. The caryometric technique used was the one largely developed at the Institute of Biology of the University of Minas Gerais (68). No differences in nuclear size which could be ascribed to differences in ploidy have been detected between normal sexes and intersexes The liver of Ophidia does not present the adult endopolyploidic growth of the nuclei as in mammals (Jacobj series). So, a unique size class of cells constitutes the liver parenchyma. If triploid or other ploidic disturbances would be the genetic basis of the intersexuality in *insularis*, it would be clearly represented n the somatic tissues by a quite different caryometric picture as the one we found in the histograms here presented.

The supposition that a disturbance in ploidy would eventually occur in *insularis* had a basis on the higher percentage of giant spermatozoids. Although this fact is not specific for the *insularis*, but found in almost all Ophidia, the *insularis* examined has a rather higher frequence of these giant spermatozoid. The possibility that these giant spermatozoid were fertile, and being either non-reduced, or haploid with dimerous chromosomes, could eventually give a triploid zygote, with consequent disturbances in sex development. As we have seen from researches in Amphibians, by Fankhauser (20,21) the study of somatic cells can give a good information on the quantitative state of the genome. So, we can, practically, dismiss our wonrking hypothesis of the triploidy as the cause of the intersexuality in *Bothrops insularis*.

7 — *Classification of the Sexual Abnormality*

The facts here examined indicats that in *Bothrops insularis* there is an abnormal condition in sex development that has as fundamental manifestation the existence of a male copulatory organ (hemipenis) in a certain number of females. We have no cytological proof to assert that these individuals are genetically females. Very little is known on the cytological determination of sex in Ophidia (56). From the caryometric analysis of somatic tissues, we can only infer that there are no differences in ploidy between the normal sexes and the anomalous in dividuals.

An indication about the genetical nature of these intersexes is given by the statistical analysis of quantitative characters and specially of the pholidotic differences. Specially remarkable is the number of ventral scales, that with great probability is a true "somatosexual" trait whose embryological determination is as early as the mesoderm segmentation into somites. A marked difference between males and females is shown by this character, although with some dispersion that gives a large overlapping territory. The statistical significance of these differences is shown with very good clearness

by the application of the "discriminant functions", which takes into consideration the whole group of sex differentiating characters.

The statistical analysis demonstrates that the intersexes belong to the *variations field of females* in almost all the quantitative characters here examined. Specially the number of ventral scales as well as the subcaudal ones which are considered by the herpetologists as a good statistical difference between sexes in almost all snakes. In some cases the variation of the quantitative characters of the intersexes towards femaleness was more distinct in the intersexes than in the true females. We must infer, thus, that from the statistical point of view, the intersexes are genetically females. The same conclusions are drawn from the embryological researches. The gonads of the embryos that bear hemipenis on one side (that would be certainly classified as intersexes if adults) are definitely females. The only embryo found without any trace of hemipenis (true female) has an embryonary ovary that was absolutely similar to the ovary of the intersexes. That in other Reptiles as in *Bothrops insularis*, the female gonad is delayed in the sexual differentiation, is a fact which must be taken into consideration. Remains of the medullar cords are still present almost at birth. A little residue of cortex in some male gonads is also a fact that must be borne in mind. Risley (63-66) determines sex inversion in reptilian embryos by stimulating with the proper hormones the residue of the structures characteristic of the opposite sex. In more advanced stages, Risley (63-66) obtained a result that can be also of some importance in the study of the *insularis*. The treatment of female embryos with male hormones, after the gonadic differentiation, leads to a development of maleness only of the region of the cloaca and of the copulatory organs.

Because of these facts, we cannot deny that some individuals, specially those belonging to the overlapping territory of the statistical variability (and that could eventually have more labile genetical sex determination), could shift during the development towards the other sex. We cannot, at present, say anything about the endocrine state of these individuals, specially about the state of development and physiology of the adrenal cortex (interrenal). The most disturbing fact in our problem is the unilaterality of the hemipenis in more than half the intersexes, and the extremely rare occurrence of, the left side hemipenis. These facts speak for a more specific genetical sex determination of the skin territory of the cloacal region. This territory is probably sensitive to both male and female hormones, but it appears that the threshold for the reaction to different hormones during development is genetically determined. Those facts appear to be rather related to the genetic differences in the various territories of the skin of gynandromorphic birds. In this connexion it may be thougth that the sensitive territory of the cloacal

skin is different in *Bothrops insularis*, as compared to other species of snakes. The cases of unilateral hemipenis could thus represent true mosaics of the genetical determination of this territory.

We can thus speak of a genetical factor that exists in some of the females of *insularis* and which determines the development of the hemipenis. This factor can act on one side only The presence of a masculine character in females can also be explained in another way, according to Wolffs discoveries (75-80) in ducks concerning the copulatory organ and the syrinx. The presence of the copulatory organ is, in this animal, the "neutral type", and exists as "anlage" in both sexes during the embryonic stage. After the differentiation of the gonads, the female hormones stop the development of the copulatory organ in the females.

The same thing seems to happen with the syrinx, and the masculine type is also the "neutral" one in all the early embryos. In the female embryos there is a successive involution that corresponds to the "feminine type" of that organ. A comparison with the case of the *insularis* can be made, with the difference that the bud of the hemipenis is present almost in all the embryos but not in some of them ("true females") as another difference must be considered the absence of the bud of this organ in about half the feminine embryos. This fact probably speaks in favour of a mechanism that differentiates sexually the cloacal skin territory sharply and earlier than in the case of the copulatory organ of the ducks. The case of the hemipenis of the *insularis* could be compared more closely with the behaviour of the mullerian ducts in the ducks in which we can find a hormonic "ambience" in the masculine embryos inducing the involution of the mullerian ducts on both sides, and the feminine environment inducing the involution of the mullerian duct on one side only.

We know, at present, nothing about the intimate mechanism of the lateral differentiation of the reactivity to the hormonic environment both for the mullerian ducts of the duck and the cloacal territory of the *insularis*. We may thus suppose that the case of true fmeales, in which no hemipenis develops, is the extreme result of hormonic inhibition of the "neutral" type of development (hemipenis). We should in this case remember the differences in horn development in some races of sheep in which the skin region from which the horns arise is probably under the command of both genetic and hormonic stimulation.

We do not know anything about endocrine activity of the embryonic gonads in *Bothrops insularis*, and we must remember that at least in the cases described (embryos of 130 mm) the hemipenis is very well developed in males and a little reduced in intersexes, and that the gonads are not yet completed

in this histological differentiation. Concerning the only female embryo without hemipenis, we cannot say with certainly from the histological degree of differentiation of the ovary that either there is a complete inhibitory effect on the "anlage" of hemipenis or there is a genetic lack of the hemipenis.

The classification of the genetical abnormalities has been sharply defined by Goldschmidt. (32-34) which cleared the great confusion in this field due, fundamentaliy, to the medical analysis of these abnormalities in man. Goldschmidt recognized only two types of abnormalities: intersexuality and gynandromorphism. The first was defined as a mosaic of the sex factors in the time, the second as a mosaic in space. We cannot discuss here the whole problem, but it is a fundamental task to try to set the case of *Bothrops insularis* into the rigth class of abnormalities. The first case observed by Hoge and Belluomini (37) was classifield as case of gynandromorphism. Really, the first cases of unilateral hemipenis in females seemed to fall in this category, but further observations of the absence of the male gonads in the anomalous individuals suggested another classification. The only case observed bearing the ovary on only one side and at the other side both an ovary and a testicle, is rather complicated, and we must wait for further confirmation.

The classification as intersexes of the anomalous *insularis* successively adopted by the authors, (38) was justifid by the study of the gonads of the embryos, and by a discussion of the general problems. This classification holds still better after the new facts revealed by more embryological researches (residues of opposite sex in bot sexes).

The newest classification of the sex abnormalities given by Padoa (58) is more suited to the case of *insularis*. He classified all deviations from the normal phenotypic state of the sexes as "intersexual". He further considers the factors of the deviation as genetical and hormonal. In both cases he distinguishes: — "gynandromorphs" and "transexuals". The first ones are determined by genetical or hormonal factors that are variable in the topographical localization, but do not vary during development. The transexuals are the cases in which the genetical or hormonal factors vary during the period and act in successive steps of the development.

The sexually abnormal *insularis* can thus be called "intersexes" as a general denomination.

The fact that only the cloacal region is concerned and that this territory itself can be different on the two sides of the body, suggests a gynandromorphic situation of the genetic and development factors of the copulatory organ. It may be a somatic mosaic of different factors between the general gonadic territory and the cloacal region which can be different on one or on both sides.

In the medical classification, the *insularis* case could be easily considered as a "feminine pseudohermaphroditism" owing to the fact that only the external sex organs are masculinized But this does not give any indication about the intimate essence of the phenomenon. Only if we could demonstrate an increase of the hormonic environment towards malleness before the determination of the histological structure of the gonad, we could call it a sligth intersexuality case. We can thus leave the term "intersexuality" for *insularis* as a general indication of a disturbance of the phenotypic expression of the sex.

As stated above, the residues of the two sex "anlage" in the gonads leave the doubt that a true transexuality can occur during the development, specially in individuals situated in the overlapping field of the statistical variability of males and females.

We are induced to introduce a new term in the classification of the *insularis* case. If we consider simply the existence of a gene or group of genes that determines the formation of the hemipenis and can be active not only in the males but also in a certain number of females (eventually with some modifying genetic and endocrine factors), just as in some species the males are provided with some female secondary sex characters (mammary gland), we can use the term "ARRENOIDISM" (existence of male characters). The introduction of this concept can possibly lead to a deeper analysis of the distribution and variation of these genes in the population in the course of 30 years period of observations. This would be an attempt to study the population genetics of a Vertebrate in a very insulated condition, and would be treated in a forthcoming publication.

SUMMARY

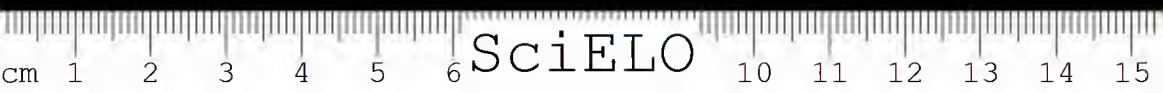
Ecological data: — *Bothrops insularis* (Amaral) 1921 is a crotalid snake that lives on a small island (Island of Queimada Grande, SP) of the South Atlanitc Ocean, near Santos, S.P. Brazil. It has never been found on the continent. The subject of the present study is the presence of a male copulatory organ (hemipenis) in a certain number of females called intersexes, a character that was never found in other feminine reptiles. The presence of such a special character in a small and strictly isolated population has been studied from two main points of view: statistically and embryologically.

Statistical researches: — the following procedure has been followed:

1 — *Sex ratio of males*, pure females and intersexes, focussing the fact that this population of snakes has been studied during a period of about 30 years, in two groups of samples with an interval of about 25 years. The capturing data show a shift in the sex ratio during this period, indicating

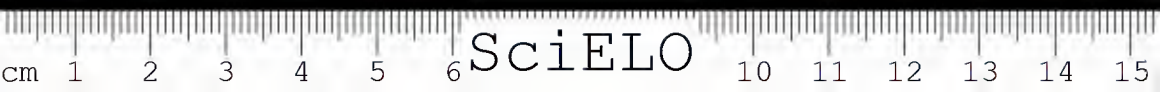
that some genetical or ecological factors are acting in the population. A reduction of the number of males, an increase of the intersexes and a stationary frequency of the females is the picture of the sexual modification of the snake population. One hundred and seventy six captured snakes have been reported as intersexes. 15 of them were pregnant and no pure females were found between them. Only intersexes are fertile, although with a clear diminution of the number of living embryos in each brood as compared with other sistematically related species living on the continent. The sex ratio of the embryos, although calculated with very few individuals, appears to have a predominance of males.

2 — *Statistical study of some quantitative characters* of these snakes (head, body and tail length; number of dorsal, ventral and subcaudal scales) has been made considering separately the males, the pure females and the intersexes; the frequency of these characters was analysed in the two samples of the collection: the first one between 1914 and 1920, and the second one between 1946 and 1953. A new method of statistical analysis has been applied besides the current ones — the "discriminant functions" — and this analysis emphasizes that the intersexes belong to the female field of variability. Some of the quantitative variable factors belong to "somatosexual" characters that are differentiated by the genetical constitution of the sex hormones. For these facts the intersexes must probably be considered as genetical females, with some genetical factor that determines the development of the copulatory organs (more or less developed) on both sides or on one side only. A sligth, non-statistically significant shift of the mean towards maleness is to be taken into consideration, because all the characters have the deviations in the same direction.

3 — *Embryological researches* carried out on embryos from intersexual mothers, as well as on some embryos and new-borns of a few continental species of snakes *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus*, *Crotalus durissus terrificus* and *Xenodon merremii*, revealed that in *Bothrops insularis*, the intersexual state can be detected since half way of the pregnancy period, by the presence ofe a more or less developed copulatory organ in almost all the embryos. The embryonic differentiation of the sex gland does not discord from the general picture of all the vertebrates although, as some authors demonstrated and we confirm for *Bothrops insularis*, the reptilian ovary retains the medullary cords for a longer time, and some residues of cortex are found in well differentiated testicles. The embryos bearing ovaries and well differentiated mullerian ducts can be divided in pure females (withouth any vestiges of hemipenis) and intersexes, bearing bilateral or unilateral hemipenis, generally less developed than those of male embryos.

For these facts, the intersexuated embryos can be classified, from the gonadic point of view, as females, in agreement with the result of the statistical research. An attempt to investigate the possibility of some ploidic disturbances in the intersexes (caryometric analysis of somatic tissues) demonstrates that this fact is not verified, because the nuclear size of males, pure females and intersexes is absolutely equal. A single specimen, among 367 examined, was quite different, bearing besides the bilateral, well developed hemipenis, a testicle on the rigth side and both ovaries. The testicle was histologically well differentiated, with ripe spermatozoids. This only case of true hermaphroditism must be left, for the present in a separate class of abnormality. The presence of residual medulla in the embryonal gonad could eventually give rise to an unusual post-embryonal development of a testicle, the transformation being total on one side and partial on the other. The pholidotic characters of this specimens are clearly visible in the overlapping field of the statistical variability, indicating, perhaps, an intermediate stage of the genetical sex factors. This case must, however, be considered as exceptional in view of the fact that a great number of true males, pure females and intersexes belong to the same overlapping territory of the statistical variability of somatosexual characters. A rather high frequency of giant spermatozoid has been found in the testicle of this specimen, but this is a fact that previous researches on the dimegaly of the head size of spermatozoid demonstrated also in many other species of snakes.

4 — *Conclusions*

The facts above summarized can lead to the statement that a snake living on a very small, overpopulated island, (in comparison with other snakes living in neighbouring areas of the continent) has an intersexual condition that manifests itself by the presence of the male copulatory organ in most of the females. A noteworthy diminution of the fertility of these intersexes was observed.

The frequency of these intersexes in the population increase markedly during 30 years of observations, together with a sensible diminution of adult males. These facts claim the possibility that in a near future the population will be constituted almost only of intersexes and few females, the males, eventually disappearing. A unique case of true hermaphroditism could eventually show the possibility that this species is evoluting towards a state of hermaphroditic reproduction, but the fact that an extremely little number of cases of functional hermaphroditism ("sufficient hermaphroditism") is known among vertebrates, and the rarity of this case, speak for an anomaly rather than a trend towards a general condition of the population.

If no hermaphroditism would develop in the population, the possible extinction of this species should be considered. The few data on sex ratio of embryos demonstrate that before the birth males are rather more frequente than females and intersexes, thus the disappearance of the males in the adult population observed in the 30 years period could probably be caused by a differential mortality of newborn males. A sex inversion of the males into intersexes, in the post-natal period is not yet demonstrated, although it cannot be excluded in at least a part of the individuals (overlapping field of somatosexual characters).

A review of the classification of the abnormality of phenotypic sex in *Bothrops insularis* authorizes the maintenance of the term "intersexuality", in the broadst sense given by PADOA. Some facts suggest that a gynandromorphic mosaic of the genetical determination of the gonadic territory and the cloacal skin territory could explain the existence of the female gonads and ducts together with the male copulatory organ; some unilateral somatic differentiation of the sensitivity towards male factors explain the unilateral distribution of the copulatory organ of the population. The facts described in this paper are compared with those found by Wolff concerning the sexual determination of the syrinx and penis of ducks.

The new term "arrenoidism" is here proposed. It defines the phenotypic appearance of a male character in females, as result of an action of a definite gene, or genes, for the hemipenis, having a certain frequency in the population, and eventually showing a different expression in the adult hormonic environment.

Some problems are posed concerning the origin of this species of snakes on the island, related sistematically to some continental *Bothrops*, as well as the possibility of extinction of the species owing to the trend observed in a 30 years period of increasing sexual abnormality in the population.

RESUMO

Dados ecológicos: — *Bothrops insularis* (Amaral) 1921 é uma serpente Crotalidae conhecida até o presente momento, como habitando exclusivamente a Ilha da Queimada Grande, no Atlântico Sul, perto de Santos, Brasil.

Êste trabalho relata a presença de órgão copulatório de machos (hemipenis) em certo número de fêmeas (chamadas intersexos) fato êsse ainda não assinalado em outros répteis. Essa pequena população, estritamente isolada, foi estudada sob dois aspectos: estatístico e embriológico.

Estudo estatístico: — Foi feito da seguinte maneira: 1) *A proporção de machos, fêmeas puras e intersexos* dessa população foi observada pela coleta

de exemplares durante um período de cêrca de 30 anos, separados em duas amostras por um intervalo de 25 anos aproximadamente. Os resultados das capturas mostram uma mudança na proporção dos sexos durante êsse período, indicando que fatôres genéticos ou ecológicos, estão atuando sôbre a população. A redução do número de machos, o aumento dos intersexos e a freqüência estacionária das fêmeas, representa o quadro da modificação sexual dessa população de serpentes. De 367 serpentes estudadas 176 são intersexos, dos quais 15 deles foram encontrados em estado de prenhês. Nenhuma fêmea pura foi encontrada em tal estado. Apenas os intersexos parecem apresentar fertilidade. Todavia, o número de embriões é menor, comparando-se com espécies afins existentes no Continente. A proporção sexual dos embriões, embora calculada sôbre poucos indivíduos, revelou uma predominância de machos.

2) *O estudo estatístico de caracteres quantitativos* dessas cobras (comprimento da cabeça, corpo e cauda), (número de escamas dorsais, placas ventrais e subcaudais) foi feito analizando, separadamente, machos, fêmeas puras e intersexos. As freqüências dêsses dados foram estudadas pela comparação dos dois grupos de amostras coletadas: o primeiro grupo capturado entre 1914 e 1920, e o segundo entre 1946 e 1953. Um novo método estatístico foi aplicado além dos usados correntemente: — a "função discriminante" e esta análise acentuou que os intersexos pertencem ao campo de invariabilidade das fêmeas, embora os histogramas revelem uma grande área de "overlapping". Alguns dos dados quantitativos pertencem aos "caráteres somatosexuais". São diferenciados pela constituição genética dos sexos, antes do início da atividade funcional das glândulas sexuais. De acôrdo com êstes fatos os intersexos podem ser considerados como geneticamente fêmeas. Devem possuir alguns fatôres genéticos que determinam o desenvolvimento de órgãos copulatórios(mais ou menos desenvolvidos) de ambos os lados ou de um lado só. Uma pequena, mas não estatìsticamente significativa mudança da *média* para com os caracteres dos machos, deve ser tomada em consideração pois todos os caracteres apresentam o desvio na mesma direção.

3 — *Estudos embriológicos* feitos nos embriões provenientes de mães intersexuadas, assim como em embriões e recém-nascidos de algumas outra espécies de serpentes (*Bothrops jararaca, Bothrops alternatus, Crotalus durissus terrificus, Xenodon merremii*) revelam que em *Bothrops insularis* o estado intersexuado pode ser observado desde a metade do período de prenhês, pela presença de um órgão copulatório, mais ou menos desenvolvido, em quase todos os embriões. A diferenciação embrionária das glândulas sexuais não difere do quadro geral dos vertebrados, porém, segundo alguns autores demonstraram, e nós pudemos confirmar em *Bothrops insularis*, o ovário dos répteis retém os cordões medulares por um tempo mais longo e alguns resíduos da

cortex são achados em testículos bem diferenciados. Os embriões, contendo ovários e ductos mullerianos bem diferenciados, podem ser divididos em fêmeas puras (sem vestígios de hemipenis) e intersexos, tendo hemipenis uni ou bilateral, geralmente menos desenvolvidos do que aquêles dos embriões machos.

Êstes fatos permitem classificar os embriões intersexuados, sob o ponto de vista das gônadas, como fêmeas, concordando com os estudos estatísticos.

Investigada a possibilidade de haver distúrbios poliploidicos nos intersexos, os estudos realizados (análise cariométrica de tecidos somáticos) demonstraram que o tamanho do núcleo dos machos, fêmeas puras e intersexos, é absolutamente igual.

Um exemplar único, entre 367 examinados, era diferente, apresentando ambos os hemipenis bem desenvolvidos, um testículo do lado direito e ambos os ovários. O testículo estava histològicamente bem diferenciado, com espermatozóides maduros. Foi encontrado um número relativamente elevado de espermatozóides gigantes. Êsse fato já foi demonstrado em várias outras espécies de cobras em pesquisas anteriores sôbre a dimegalia do tamanho da cabeça do espermatozóide. Êste foi o único caso de verdadeiro hermafroditismo assinalado.

É lembrada a possibilidade da presença de resíduos medulares em gônadas femininas vivas embrionárias, eventualmente darem origem a desenvolvimento post-embrionário em sentido masculino, bem como o desenvolvimento dos resíduos corticais dos testículos, poderia levar a transformação total ou parcial dêstes embriões em fêmeas. Os caractéres da folidose dêste exemplar estão claramente situados no campo do "overlapping" da variabilidade estatística, indicando, talvez, um estado intermediário dos fatôres genéticos do sexo. Deve-se acrescentar, porém, que grande número de machos, fêmeas e intersexos, pertencem ao mesmo território de "overlapping" da variabilidade estatística dos caractéres somatosexuais.

4 — *Conclusões*

Os fatos acima mencionados levam a constatação de que uma serpente que vive numa pequena ilha, superpovoada pela referida *B. insularis* (comparada com as serpentes que vivem em áreas vizinhas do continente) tem uma constituição intersexuada que se manifesta pela presença de órgãos copulatórios machos na maioria das fêmeas. Foi observada uma diminuição de fertilidade nêsses intersexos.

A freqüência dêstes na população aumentou lentamente durante 30 anos juntamente com uma diminuição sensível dos machos. Êstes fatos permitem prever que, num futuro próximo, a população tenderia a ser constituída quase

sòmente de intersexos e de poucas fêmeas, desaparecendo eventualmente todos os machos, o que levaria à extinção da espécie. Um único caso de verdadeiro hermafroditismo poderia, eventualmente, mostrar a possibilidade de que esta espécie tenderia a evoluir para um estado de reprodução hermafrodita. O fato de apenas ser conhecido número reduzido de casos de hermafroditismo (hermafroditismo suficiente) entre vertebrados, fala mais a favor de se considerar êste caso como uma exceção.

Os poucos dados sôbre a relação sexual dos embriões parecem demonstrar que, antes do nascimento, os machos são mais frequentes do que as fêmeas e intersexos. O desaparecimento dos machos, observado na população durante um período de 30 anos, poderia, provàvelmente, ser causado por mortalidade maior dos mesmos quando recém-nascidos. Uma inversão dos machos em intersexos, no período post-natal, não foi ainda demonstrada. Entretanto não pode ser totalmente excluida devido o "overlapping" apresentado pelos caractéres somatosexuais.

Uma revisão da classificação da anomalia do fenotipo no sexo de *Bothrops insularis*, autoriza o uso do têrmo "intersexualidade", de acôrdo com o conceito mais amplo dado por Padoa. Alguns fatos sugerem que o mosaico ginandromórfico da determinação genética do território gonático e do território da pele da cloaca, poderia explicar a existência de gônadas femininas e ductos de Muller ao lado dos órgãos copulatórios masculinos. Outra possibilidade seria uma diferenciação somática unilateral ou bilateral da sensibilidade para com os fatôres masculinos, o que explicaria a distribuição do órgão copulatório na população.

São feitas algumas comparações entre os fenômenos aqui observados e os estudados por Wolff na determinação sexual dos territórios formativos da "syrinx" e dos penis nos patos.

Um novo têrmo, "arrenoidismo", é aqui proposto. Êle define o aparecimento de caractéres de machos em fêmeas como resultado da ocorrência de um gen para o hemipenis, existente na população.

EXPLANATION OF THE FIGURES

(*Microphotographs*)

Plate 7

A — Embryo of *Bothrops insularis* of 35-40 mm (769) X 100
B — " " *Bothrops insularis* " 35-40 mm (770) (longitudinal) X 100
C — " " *Bothrops insularis* " 35-40 mm (770) X 450

Plate 8

D — " " *Bothrops insularis* " 60-70 mm (773) X 35
E — " " *Bothrops insularis* " 60-70 mm (773) X 450
F — " " *Bothrops insularis* " 60-70 mm (773) X 1000 Gonocytes in the cortex.

Plate 9

G — " " *Xenodon merremii* " 90 mm (386) Testicle X 35
H — " " *Xenodon merremii* " 90 mm (386) Residual of cortex X 450

Plate 10

I — " " *Bothrops insularis* " 130 mm (740) "a" Testicle X 100
J — " " *Bothrops insularis* " 130 mm (733) "d" X 35. Ovary
L — " " *Bothrops insularis* " 130 mm (733) "d" X 100. Ovary
M — " " *Bothrops insularis* " 130 mm (733) "d" X 450. Ovary

Plate 11

N — " " *Bothrops insularis* " 160 mm (727) "a" 35. Male, no Mullerian ducts
O — " " *Bothrops insularis* " 160 mm (727) "a" X 100. Testicle.
P — " " *Bothrops insularis* " 160 mm (727) "a" 450. Gonocytes in medullar cords.

Plate 12

Q — " " *Bothrops insularis* " 160 mm (728) "e" X 35. Ovary Mullerian ducts visibles.
R — " " *Bothrops insularis* " 160 mm (728) "e" X 100
S — " " *Bothrops insularis* " 160 mm (728) "e" X 450. Cortex and medullary cords.

Plate 13

T — " " *Xenodon merremii* " 180 mm (729) X 100. Testicle with medullary cords.
U — " " *Xenodon merremii* " 180 mm (729) X 450. Medullary cords with gonocytes.

Plate 14

V — " " *Xenodon merremii* " 180 mm (730) X 100. Ovary
W — " " *Xenodon merremii* " 180 mm (730) X 450. Ovary. Cortex with gonocytes.

Plate 15

X — Hermaphrodytes (N.º 15.843 *Col. I. B.*). Smear of the content of the cloaca. Spermatozoa. In the middle a giant spermatozoid. X 1000 (761).
Z — Testicle of hermaphrodyte (N.º 15.843 *Col. I. B.*) (761) X 35
Za — Testicle of hermaphrodyte (N.º 15.843 *Col. I. B.*) (761) X 450.

Notes: — The number as 761 are the number of hystological series.
The indications "a", "d", and "e" refer to the series of embryo of the same mother.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Emilio Varoli, Diretor of the Division of the Agriculture Department of the State of S. Paulo, and Dr. Joaquim Ribeiro de Moraes, Director of the Fishing Institute of Santos, for their cooperation in our expeditions, to the Director of the Oceanographic Institute, Prof. W. Besnard, for the facilitation in the conveyance at the last expedition, to the II Army — São Paulo, in the person of his Commander General, Stenio Caio de Albuquerque Lima, and his officers Cel. Americano Freire, Ten. Cel. los Reis, Major Afonso Figueiras, Sub-Ten. Caolino Margotti, José Eleutério dos Santos and Sarg. Ibrahim D. Atallah for rádio-communication during the three last expeditions to the Island; and to the Brazilian Air-Force (FAB), specially to the Airport of Cumbica, in the person of Cel. Faria Lima, head-commander and his officers Cel. Ivo Gastoldoni, Ten. Cel. med. Dr. José Amaral, Cap. Mariotto, Ten. Dutra for all facilities to obtain photographs of the Island and for saving the components of the last Expedition isolated by a storm, by his Service SAR.

We are also grateful to the "Companhia das Docas" of Santos, the Marine Police and to the Customs of Santos for placing at our disposal their ships for ours expeditions, to Drs. J. P. Memoria, Norma Nelucci from the Faculty of Philosophy of Minas Gerais for the collaboration in statistical and cariometrical questions, and to Dr. R. L. Araujo from the Instituto Biológico for the correction of the text.

Furthermore we are indebted to Dr. G. Rosenfeld, Directer of the Hospital Vital Brasil, and Dr. R. S. Furlanetto, Head of the Section of Immunology and Immunotherapy for the assistance given as physicans during the expeditions, to the personal from the Section of Ophiology Mrs. Pedro Villela, J. D. Cavalheiro, Francisco Cavalheiro and Joaquim Cavalheiro, who collected the material in the expeditions.

Finally, we thank to the Laboratories Johnson, Parke Davis, Roche, Ciba, Silva Araujo Roussel, Torres, Merck, Bristol Labor, Andrômaco, Lilly and Rhódia, for the pattern and products kindly furnished for the organization of our pharmacies.

LITERATURE

1) Allen, E. — Sex and Internal Secretion — 2.ª edição, Baltimore. 1939. U.S.A.

2) Amaral, A. do — Contribuição para o conhecimento dos ofidios do Brasil, *Lachesis insularis* sp. n. *Anexos das Memórias do Instituto Butantan, Secção de Ofiologia,* I fasc. 1:18-37, 1921.

3) Amaral, A. do — Excursão à Ilha da Queimada Grande: Notas sôbre a Biologia de um *Lachesis* alí existente. *Collectânea dos Trabalhos do Instituto Butantan,* Vol. 11:49-55, 1918-1924.

4) Baker, J. R. — On sex intergrade pigs: their anatomy, genetics and development. *Bul. Jour. Exp. Biol.* 2:247-262, 1924-25.

5) Baker, J. R. — A New Type of Mammalian Intersexuality. *J. Exper. Biol.* VI:56-62, 1928.

6) Brambell, Rogers F. W. — The development of sex in Vertebrates. London 1-261, 1930.

7) Caullery, M. — Organisms et sexualité. Paris, S. Doin, 1-489, 2.ª ed., 1951.

8) Cieslak, Edwin S. — Relations between the Reproductive Cycle and Pituitary Gland in the Snake *Thamnophis radix. Physiological Zoology,* Vol. XVIII, 3:299-329, 1945.

9) Chieffi, Giovanni — Sull'Organogenesi dello, Interrenale e della Medulla della Gonade in *Torpedo ocellata* e in *Scylliorhinus canicula. Pubbl. Staz. Zool. Napoli,* Vol. XXIII: 186-200, 1952.

10) CNRF — La differentiation sexuelle chez les Vertebrés. *Colloques Internationaux* XXX, 1951.

11) Crew, F. A. E. — Abnormal sexuality in animals. I. Genotypical. *Quart. Rev. Biol.* 1:315-359, 1926.

12) Crew, F. A. E. — Abnormal sexuality in animals. II. Physiological. *Quart. Rev. Biol.* 2:249-266, 1927.

13) Crew, F. A. E. — Abnormal sexuality in animals. III. Sex reversal. *Quart. Rev. Biol.* 2:427-441, 1927.

14) Dammerman, K. W. — The fauna of Krakatau Verlaten Island and Sebesy *Traubia Batavia,* 3:61, 1923.

15) Dantchakoff, V. — Determinisme et réalization dans le devenir du sexe. *Act Sci. Ind.* 300, 1935.

16) Dantchakoff, V. — Sur l'action de l'hormone sex. fem. chez les Reptiles. *C. R. Ac. Sci.* 205:424-426, 1937.

17) Dantchakoff, V. — Uber chemische Werkzevge bei der Realisation normal bestimmter embryonale Geschlechtlicher Histogenese bei Reptilen. *Arch Entw. Mech.* 138:464-521, 1938.

18) Dantchakoff, V. — Sur la deficience d'effects des hormones fem. dans l'histogenese femelle induite chez le lezard et sur les moyens d'y remedier. *C. R. S. B.* 130:248-249, 1939.

19) Dobzhansky, T. and Spassky, B. — Intersexes in *Drosophila pseudobscura. Proc. Nat. Acad. Sci.* 27:556-562, 1941.

20) Fankhauser, Gerhard — Sex Differentiation in Triploid Salamanders. (*Triturus viridescens*). *The Anatomical Record,* 72 (4):70, 1938.

21) Fankhauser, Gerhard — Triploidy in the Newt, *Triturus viridescens*. *Proceedings of th American Philosophical Society*, 79 (4):715-738, 1938.

22) Fischer, E. — Genetik und Stammgeschichte der Menschlichen Wirbelsäule. *Biol. Zbl.* 53:203-220, 1933.

23) Fisher, R. A. — The use of multiple measurement in taxonomic problem. *Annals of Eugenics* 7:179-188, 1936.

24) Forbes, R. T. — Effects of injection of whole pituitary gland extract on immature alligator. *Proc. Soc. Exp. B. A. M.* 31:1129, 1934.

25) Forbes, R. T. — Studies on the reproductive system of the alligator, 1.º: The effect of prolong. injection of pituitary whole gland extr. in the immat. alligator. *Anat. Rec.* 70:113-137, 1937.

26) Forbes, R. T. — Studies ou reproductive system of alligator. II.º: The effects of prolong. injection of estrone in the immature alligator. *J. Exp. Zool.* 78:335-368, 1938.

27) Forbes, R. T — Studies on reproductive system of alligator. III.º: The action of testad. on the acces. Sex and estructures of recently hatched females alligator. *Anat. Record* 72:87-97, 1938.

28) Forbes, R. T. — Studies on the reproductive system of the Alligator. V.º: The effect of injection of test. prop. in immat. male alligator. *Anat. Record* 75:51, 1939.

29) Fox, Wade — Effect of Temperature on Development of Scutellation in the Garter Snake, *Thamnophis elegans atratus*. *Copeia*, 4:252-262, December, 1948.

30) Gadow, Hans — Amphibia and Reptiles. London, Macmillan and Co., 1920.

31) Goldschmidt, R. — Mechanism und Physiologie der Geschlechtsbestimung. Berlin, 1920.

32) Goldschmidet, R. — Die Sexuellen Zwischentufen. Berlin, 1931.

33) Goldschmidt, R. — Le determinisme du sexe et l'inter-sexualité. *Alcan*. 1-192, Paris, 1937.

34) Goldschmidt, R. — The material Basis of Evolution. *New-Haven — Yale University Press*, 1-436, 1940.

35) Hoge, A. R. — Um novo lagarto da Ilha da Queimada Grande. *Memorias do Instituto Butantan*, 9:241-248, 1946.

36) Hoge, A. R. — Fauna herpetológica da Ilha da Queimada Grande. *Memórias do Instituto Butantan*, 22:151-172, 1950.

37) Hoge, A. R. e Belluomini, H. E. — Ginandromorfismo em *Bothrops insularis*. Soc. Biol. São Paulo. Comunicação: 27-2-1953.

38) Hoge, A. R., Bellnomini, H. E. Schreiber, G. — Intersexuality in a higly isolated population of snakes. *Atti IX Congr. Intern. di Gen. Cariologia*, Vol. suppl. 964-965, 1954.

39) Humphrey, R. R., Briggs, R. and Fankhauser, G. — Sex differentiation in triploid *Rana pipiens*. Larvae and the subsequent reversal of female to males. *The Journal of Exp. Zool.* Vol. 115, (3):399-427, 1950.

40) Johnson, P. O. — Statistical methods in Research. Pontiac — Hall, Inc. New York, 1950.

41) Kehl, R. — Action de l'androster. sur le segm. sexual urisaire de l'*Uromastix* femelle. *C. R. S. Biol.* 127, 1938.

42) Kehl, R. — Action de 1.ª progestine sur l'oviducte de l'*Uromastix*. *Bull. Hist. appl.* 1, 1941.

43) Kehl, R. — Etude de quelques problemes d'eudocrinologie genitale chez un Batracien nortafricain — *Discoglossus* — et certains Reptiles du sudalgerien. Rev. Can. Biol. (Thèse), 1944.

44) Kehl, R. and Combescot, C. — Reproduction in Reptilia in the Comparative Physiology of reproduction and the effect of sex hormones in Vertebrate. *Memoirs of the Soc. for Endocrinology*, 4:57-74, Cambridge, 1955.

45) Kendall, M. G. — The Advanced Theory of Statistics. Vol. 2, Charles Griffon and Co. London, 1946.

46) Klauber, Laurence M. — A Statistical Study of the Rattlesnakes; I. Introduction; II. Sex Ratio in Rattlesnake Population; III. Birth Rate. *Occ. Papers San Diego Soc. Nat. Hist.* 1:1-24, 1936.

47) Klauber, Laurence M. — A Statistical Study of the Rattlesnakes. IV. The Growth of the Rattlesnake. *Occ. Papers San Diego Soc. Nat. Hist.* 3:1-56, 1937.

48) Klauber, Laurence M. — A Statistical Study of the Rattlesnakes. V. Head Dimensions. *Occ. Papers San Diego Soc. Nat. Hist.* 4:1-53, 1938.

49) Klauber, Laurence M. — A Statistical Study of the Rattlesnakes. VI. Fangs. *Occ. Papers San Diego Soc. Nat. Hist.* 5:1-61, 1939.

50) Klauber, Laurence M. — 1. Tail-length differences in snakes, with notes on sexual dimorphism and the coefficient of divergence. 2. A graphic method of showing relationships. *Bull. of Zool. Soc. San Diego*, 18:1-76, 1943.

51) Klauber, Laurence M. — Herpetological Correlations. I. Correlations in Homogeneous Populations. *Bull. Zool. Soc. San Diego* 21:1-101, 1945.

52) Köeppen, Wlademir — Das geographische System der Klimate. *Verl. Gebr. Borntraeger*, Berlin, 1936.

53) Kuhne, K. — Die Verebung der Variationen der menschlicher Wirbelšule. *Z. Morph. v. Anthrop.* 30:1-221, 1932.

54) Leão, A. T. — Sôbre dois batraquis da Ilha da Queimada Grande. *Memórias do Instituto Butantan*, 22:139-150, 1950.

55) Lebedeff, G. A. — Genetics of Hermaphroditism in *Drosophila virilis*. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 20:613-616, 1934.

56) Matthey, R. and Brink, J. M. Van — La question des hétérochromosomes chez les Sauropsidés. I. Reptiles. *Experientia*, 12, (2):53-57, 1956.

57) Matthey, R. — Intersexualité chez une tortue. *C. R. Soc. Biol.* 97, 1927.

58) Padoa, E. — Storia naturale del sesso *Einaudi*, 1-561, Torino, 1948.

59) Penha, A. M., Schreiber, G. Hoge, A. R. Belluomini, H. E. — Aplicação da função discriminante a um problema de diferenciação de sexos em cobras. Reunião da *Biometric Society*, S. Paulo, 1956.

60) Ponse, Kitty — La differenciation du sexe et l'intersexualité chez les Vertebrés. *Libr. de l'Université*, Lausanne, 1-366, 1949.

61) Rae, A. L. — The Genetics of the Sheep. *Advances in Genetics*, 8:189-265, 1956.

62) Rao, C. R. — Advanced Statistical Methods in Biometric Research. John Wiley And Sons, Inc. New York, 1952.

63) Risley, P. L. — Contribution on the development of the reproductive system in the Musk turtle (*Sternotherus odoratus* Latreille). III. Gonadogenesis and sex differentiation. *Z. Zellf. mikr. Anat.* 18:493-593, 1933.

64) Risley, P. L. — Effect of gonadrophropic and sex horm. on the urogenital system of juvenile diamond — back terrapins. *Anat. Rec.* 75 suppl. 104, 1939.

66) Risley, P. L. — A comparison of effects of gonadotr. and sex hormons an the urogenital *J. Morphol.* 67:439-453, 1940.

66) Risley, P. L. — A comparison of effects of gonadotr. and sex horms on the urogenital system of jnveniles terrapins. *J. Exp. Zool.* 87:477-515, 1941.

67) Schreiber, G. — Pesquizas da citologia quantitativa, II. A terceira divisão e a dimegalia na espermatogênese dos ofidios. *1.ª Reunião Conjunta das Soc. de Biol. do Brasil*, São Paulo, 1946.

68) Schreiber, G. — Statistical and physiological stndies on the interphasic growth of the nucleus. Biol. Bull., 97:187-205, 1949.

69) Schrieber, G., Hoge, A. R., Belluomini, H. E., Penha, A. M. — Further Researches on Intersexuality in a highly isolated population of Snakes. *Proc. X Intern. Congress of Genetics*, II:254-255, 1958.

70) Sewertzoff, A. N. — Morphologische Gesetzmassigkeiten der Evolution. *Jena. Fischer* p. 369, 1931.

71) Steiniger, F. — Die Genetik uud Phylogenese der Wirbelsaulen varianten und der Schwanz reduktion. *Z. F. Mensch. Vererb.* n. Konstit. 22:583-668, 1938.

72) Vannini, Enrico — A proposito dell'Origine interrenale del tessuto midollare della gonade negli Anfibi e negli Uccelli. *Rendiconti dell'Accademia Nazionale dei Lincei*, serie VIII, Vol. VI, fasc. 4:511-518, 1949.

73) Vannini, Enrico, e Cessi, Tina — Comuanza di origine fra il blastema della corteccia surrenale e il tessuto midollare della gonade nell'embrione di cavia. *Redicconti dell'Accademia Nazionale del Lincei*, serie VIII, Vol. VI, fasc. 5:630-636, 1949.

74) Vanzolini, P. E. e Brandão, J. H. Ferreira — Notas sôbre algumas diferenças sexuais na folidose de *Bothrops alternata* D. & B., 1854 e sua variação geográfica. *Mem. Inst. Butantan*, 18:251-258, 1944/1945.

75) Wolff, E. — Les changements du sexe. *Gallinard*, 1-306, Paris, 1946.

76) Wolff, Em. — La differenciation Sexualle Normale et le Onditionnement Hormonal des Caractères Sexuels somatiques precoces, Tubercule génital et Syrinx, chez l'embryon de Canard. *Bull. Biol. de la France et de la Belgique*, 84, (2):119-193, 1950.

77) Wolff, Etienne — Le Rôle des Hormones Embryonnaires dans 1.ª Différenciation Sexuelle des Oiseaux. *Arch. D'Anat. Microsc. et de Morph. Exp.* 39, (3):426-450, 1950.

78) Wolff, Etienne et Wolff, Emilienne — The effects of castration on Bird Embryos. *The Journ. Of Exp. Zool.* 116, (1):59-97, 1951.

79) Wolff, Etienne — Le Rôle des hormones embryonnaires dans 1.ª différenciation sexuelle primaire des Oiseaux. *Act. XI Congr. Int. Orn.*: 86-103, 1954.

80) Wolff, Etienne et Wolff, Emilienne — Le Déterminisme de 1.ª Différenciation Sexuelle de 1.ª Syrinx du Canard Cultivée in vitro. *Bull. Biol. de la France et de la Belgique*, 86, (4):325-349, 1952.

NOTAS DE ACAROLOGIA

XLVI — ACAROFAUNA ZOOPARASITA NA BOLÍVIA

POR

FLAVIO DA FONSECA

(Instituto Butantan)

O estudo da Acarologia atravessa hoje fase que lembra aquela por que passou o estudo dos *Insecta* quando ainda não era conhecido o seu papel na transmissão de doenças infecciosas e sòmente os que se interessavam pela ciência sem visar aplicação se dedicavam ao conhecimento da fauna de insetos, encan-

tados com o que descobriam e com as verdades que eram reveladas. O exemplo do que tem acontecido a tantos ramos da pesquisa, inclusive a Entomologia, está a indicar que nos achamos no limiar de importantes descobertas sôbre o papel desempenhado pelos Ácaros na transmissão de doenças ao homem, a animais e a plantas. Não importa que não tenhamos oportunidade ou competência para apresentar as provas do interêsse dessas novas verificações. Pesquisar hoje neste capítulo significa prever que outros demonstrarão o valor do que agora foi por nós revelado.

Aos poucos vai se fazendo alguma luz sôbre a fauna acarológica da América do Sul, sôbre a qual, exceptuados os Ixodidas, reinava, até vinte anos atrás, ignorância que só não era total porque havia citação de alguns Sarcoptídeos descritos por Trouessart e de raros Laelaptídeos e Trombiculídeos descobertos principalmente por Oudemans, Ewing e Sambon.

Ùltimamente, sobretudo devido à atividade do Dr. J. M. de la Barrera, me foi dada oportunidade de estudar material da Bolívia e do Perú, o qual, somado ao que venho pesquisando há mais de vinte anos do Brasil e às descrições feitas por Boshell e Kerr de 25 espécies de Trombiculídeos da Colômbia, permitem começar fazer uma idéia aproximada do vulto da fauna acarológica neotrópica de parasitas, agora de distribuição melhor conhecida tanto no sentido horizontal, quanto no vertical, pois são já conhecidas espécies andinas.

Sem embargo de não divergir muito da neoártica e da do velho mundo, ainda assim tem sido possível surpreender peculiaridades dessa fauna, tais como as representadas pelos gêneros *Acanthochela* Ewing, *Bolivilaelaps* Fonseca, *Gigantolaelaps* Fonseca, *Mysolaelaps* Fonseca, *Schistolaelaps* Fonseca e *Tur* Baker et Wharton, todos de ratos silvestres; *Cavilaelaps* Fonseca e *Neoparalaelaps* (Fonseca), especialisados no parasitismo de Cavídeos; *Dasyponyssus* Fonseca, do Tatú; *Tinaminyssus* Strandtmann, de macucos e codornas; *Edentalges* Fonseca e *Psoralges* Trouessart, encontrados sôbre *Xenarthra*; *Kolenationyssus* Fonseca e *Radfordiella* Fonseca, de Morcegos.

Da Bolívia não consta tenha sido jamais feita coleta acarológica de certo interêsse. Além do encontro de *Ixodidae*, apenas temos conhecimento de ter sido descrito, capturado sôbre um *Isotrix bistriatus* Wagner, sem indicação mais precisa da localidade ou do capturador, o então novo gênero e espécie *Bolivilaelaps tricholabiatus* Fonseca 1940, enviado ao autor pelo conhecido especialista em *Mallophaga* e *Anoplura*, Fabio L. Werneck, do Instituto Oswaldo Cruz.

Recebemos recentemente, através da Oficina Sanitária Panamericana, 62 lotes de material muito interessante capturado na Bolívia entre 1954 e 1955,

pelo Dr. J. M. de la Barrera, a cuja infatigável operosidade como orientador de capturas a Zoologia deve tantas aquisições novas.

Nesse material foi encontrado um Lelaptídeo do gênero *Mysolaelaps* característico da fauna de roedores do nordeste brasileiro, região situada a alguns mil quilômetros de distância. Também foi achada espécie do gênero *Cavilaelaps*, originalmente descrita de Cavídeo argentino, além de três outras espécies de outros gêneros, do Brasil meridional, das quais uma também assinalada na Argentina e no nordeste brasileiro e outra, um *Eubrachylaelaps*, já registrada no Perú. Igualmente digno de nota é o achado de novos Lelaptídeos pertencentes ao gênero *Tur* Baker et Wharton (= *Protonyssus* Turk 1946 *non Protonyssus* Trouessart 1915), um dos quais, logo a seguir, recebemos de localidade já próxima da foz do rio Amazonas, a bons dois mil quilômetros em linha reta da região boliviana, também tributária da bacia amazônica, onde havia sido primeiro colhido por de la Barrera. Ofereceu ainda o rico material da Bolívia oportunidade de observar uma espécie de *Laelaptidae* provida de órgão sensorial no primeiro artículo dos palpos, tal como o de *Eulaelaps vitzthumi* Fonseca 1935, acabado de descrever do Perú. Sete espécies novas de *Laelaptidae, Macronyssidae* e *Trombiculidae* são aquí descritas e a lista de novos hospedeiros de espécies já conhecidas, inclusive de *Ixodides*, é muito aumentada.

Ixodides

Na Bolívia, onde ainda não foi realisado inquérito sôbre a fauna ixodológica, apenas existem referências esparsas à ocorrência de poucas espécies, tais como *Ornithodoros rostratus* Aragão 1911; *Ixodes boliviensis* Neumann 1904; *Ixodes cooleyi* Aragão et Fonseca 1951; *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787); *A. coelebs* Neumann 1889; *A lutzi* Aragão 1908 (= *A. cooperi* Nutall et Warburton 1908); *A. incisum* Neumann 1906; *A. longirostre* Koch 1844; *A. parvitarsum* Neumann 1901; *A. scalpturatum* Neumann 1906; *Boophilus microplus* (Canestrini 1890).

A essas observações, que, com exceção das de *A. ovale* e *A. longirostre*, registradas na Monografia de Robinson, são tôdas devidas a Neumann, a Aragão e a Fonseca, é possível agora adicionar várias outras, tôdas de espécies já conhecidas e em sua maioria pertencentes à fauna neotrópica.

No material em estudo foram encontrados os seguintes representantes da sub-ordem *Ixodides*:

Argasidae

Gênero *Ornithodoros*

Ornithodoros sp.

Lote N.º 3549, capturado em fase de larva sôbre *Lagidium viscaccia* em Monos.

Ixodidae

Gênero *Ixodes*

Ixodes luciae Senevet 1935.

Encontrado duas vêzes, das quais uma parasitando um marsupial do gênero *Didelphys,* cujos membros são seus habituais hospedeiros, o *Didelphys paraguayensis,* da localidade de Buen Retiro, Bolívia, no qual foram colhidos um macho e três fêmeas, além de larvas e ninfas, tendo esse lote recebido o N.º 3549. A outra captura foi de uma única fêmea, obtida sôbre *Cuniculus paca paca,* de Buen Retiro, o qual recebeu o N.º 3540. Demonstra este encontro não ser *Ixodes luciae* espécie tão adaptada, na fase adulta, aos *Didelphys* quanto o é o seu congênere *Ixodes loricatus.*

Ixodes sp.

Ninfas ou larvas de *Ixodes* sp. foram identificadas nos seguintes lotes:

N.º 3541 — de *Oecomys mamorae* capturados em Buen Retiro.

N.ºs 3543 e 3544 — de *Graomys griseoflavus* capturados em Buen Retiro.

N.º 3547 — de *Dasyprocta variegata* da localidade de Buen Retiro.

Gênero *Amblyomma*

Amblyomma cajennense (*Fabricius* 1787)

Uma fêmea e uma ninfa desta espécie encontradas sôbre a cotia *Dasyprocta variegata* em Novillos, receberam o N.º 3550.

Amblyomma calcaratum Neumann 1899

Machos desta espécie foram obtidos em um *Tamandua tetradactyla* de Buen Retiro, recebendo o N.º 3539.

Amblyomma nodosum Neumann 1899

Do mesmo exemplar de Tamanduá acima referido foram colhidos machos desta espécie, a qual, como a precedente, é especializada no parasitismo de *Myrmecophagidae,* tendo sido registrados sob o N.º 3538.

Amblyomma tigrinum Koch 1844

Esta espécie vem sendo confundida com *A. maculatum* Koch 1844 desde muitos anos, só recentemente tendo sido revalidada por Kohls, que examinando os tipos de Koch, verificou ser boa espécie, tal como o *A. triste* Koch 1844. O verdadeiro *A. maculatum* Koch predomina na América do Norte e, na opinião de Kohls, nunca teria sido capturado mais ao sul que na Colômbia e Venezuela.

No material boliviano foi achado um macho de *A. tigrinum*, N.º 3551, sôbre *Cerdocyon thous*, de Ipati, tendo a identificação sido feita pelo Prof. H. Aragão que acabara de receber de Kohls cópia datilografada do seu trabalho antes de publicado. É espécie frequente no Brasil Central onde parasita muitos animais silvestres, principalmente carnívoros, sendo também encontrado sôbre o cão e, raramente, sôbre o homem.

Amblyomma sp.

Exemplares jovens, não identificados, de espécies do gênero *Amblyomma* foram capturados sôbre os seguintes hospedeiros:

Dasyprocta variegata de Buen Retiro; lote N.º 3545. *Rattus alexandrinus* de Pirirenda e Charagua, respectivamente lotes N.ºs 3554 e 3560. *Galea musteloides*, os dois primeiros lotes de Vale Grande, os seguintes respectivamente de Cuevo, Charagua, Tarija e Padilla; lotes N.ºs 3553, 3556, 3558, 3559, 3561, 3564. *Lagostomus maximus* de Cabezas; lote N.º 3555. *Tamandua tetradactyla* de Vila Montes: lote N.º 3557. *Oryzomys* sp. de Gutierrez: lote N.º 3562. *Hesperomys muricolus* de Cabezas; lote N.º 3563.

Gênero *Hemaphysalis*

Hemaphysalis leporispalustris Pakard 1869. Obtidos de *Sylvilagus brasiliensis paraguayensis* em Buen Retiro e em Boyuiba, respectivamente em fase adulta e imatura; lotes N.ºs. 3542 e 3552.

Mesostigmata

Laelaptidae

Gênero *Cavilaelaps* Fonseca 1936

Cavilaelaps bresslaui Fonseca 1936

Esta espécie, originalmente descrita de *Microcavia australis* (= *Caviella australis*) da Argentina, é agora assinalada na Bolívia parasitando ora um cavídeo, no qual é mais frequente, ora ratos, tendo sido encontrada sôbre os seguintes hospedeiros:

Lotes N.os 3483, 3488, 3490, 3482, 3504, 3508, 3526, 3527 e 3535 — *Galea musteloides* de Samaipata, a 1650 metros de altitude, de Valle Grande e de Padilla.

Lote N.º 3475 — *Akodon mollis* de Novillos, a 1830 metros de altitude.

Lote N.º 3482 — *Oxymycterus doris* de Valleabajo, a 1500 metros de altitude.

Lotes N.os 3486, 3499 e 3504 — *Graomys griscoflavus* de Samaipata e de Água Hedionda.

Lote N.º 3501 — Hosp.? Localidade?

É interessante assinalar que a única espécie congenérica, *Cavilaelaps braziliensis* (Ewing 1925), que parasita *Galea spixii* do nordeste brasileiro, não foi assinalada em ratos no extenso inquérito em que foram examinados Ácaros de mais de dois mil ratos daquela região. Por outro lado, o *Neoparalaelaps bispinosus* (Fonseca 1936), habitual parasita do cavídeo *Cavia aperea*, seu único hospedeiro em São Paulo, Brasil, foi encontrado por duas vêzes em *Akodon arviculoides cursor* em Ouro Prêto, Minas Gerais, Brasil, onde, tal como na localidade tipo, também é mais frequente em *Cavia aperea*.

A distinção entre as duas espécies de *Cavilaelaps* foi estudada por Fonseca em trabalho versando sôbre os Ácaros parasitas do Estado do Maranhão, onde a espécie de Ewing foi também encontrada sôbre *Galea flavidens*. *Neoparalaelaps* (Fonseca 1936) Fonseca 1936 continua sendo gênero monotípico.

Cosmolaelaps bregetovae sp.n.

Figs. 1 e 2

Entre as espécies aqui estudadas há uma cujos caracteres lembram antes as de vida livre, mas referida pelo capturador como encontrada sôbre um *Oxymycterus doris*, rato que achamos também parasitado por um *Ischnolaelaps* e por um *Eulaelaps*, deixando-nos a vaga impressão de ter o material sido capturado em ninho. Trata-se de ácaro cujo aspecto geral lembra o da espécie de Sumatra, *Hypoaspis macrocheles* Vitzthum 1931, descrito e gràficamente representado no trabalho "Terrestische Acarinen der deutschen limnologischen Sunda-Expedition". Ainda mais próxima é a presente espécie das do gênero *Cosmolaelaps* Berlese 1903, cosmopolita, como indica o nome, e já assinalada na América do Norte.

Sem embargo de coincidir no seu aspecto geral e em algumas particularidades, tais como a constrição das mandíbulas, com o gênero de Berlese, a espécie em estudo difere de tôdas as que conheço por um detalhe que lhe é próprio e constituirá a mais acentuada característica específica: a largura desmensurada das *peritrematalia*, que lembram as de *Pachylaelaptidae* e de certos *Eviphis*.

Descrição da fêmea

O aspecto geral lembra o de um *Atricholaelaps*, medindo o comprimento total até o ápice dos palpos 1050 micra, chamando a atenção as longas patas anteriores e o segundo par relativamente robusto.

Idiossoma — Mede 770 micra de comprimento por 530 de maior largura ao nível do 3.º par.

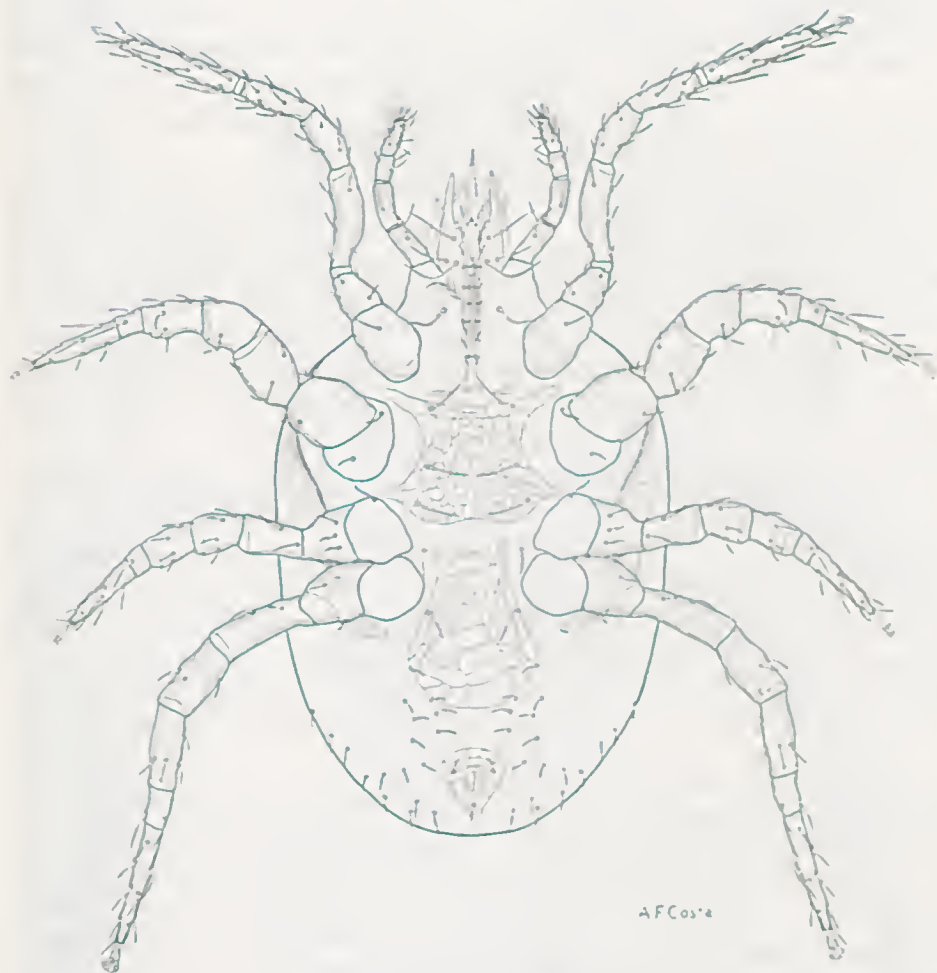



Fig. 1 — *Cosmolaelaps bregetovae* sp. n.

Face ventral. — Placa esternal de aspecto escamoso, quase tão longa quanto larga, com 126 micra de comprimento na linha média por 140 micra de menor largura e 252 micra de maior largura ao nível das expansões posteriores, com

bordo posterior côncavo na região média. Cerdas anteriores com 80 micra, médias com 65 e posteriores com 55 micra, ao contrário do observado na maioria dos *Laelaptidae* cujas cerdas esternais ou são subiguais ou de tamanho progressivamente crescente para trás. Tritoesterno bifurcado a partir da união do têrço posterior com o médio, moderadamente filamentoso. Duas estreitas plaquetas transversais representam as *jugularia*. Placas metaesternais rudimen-

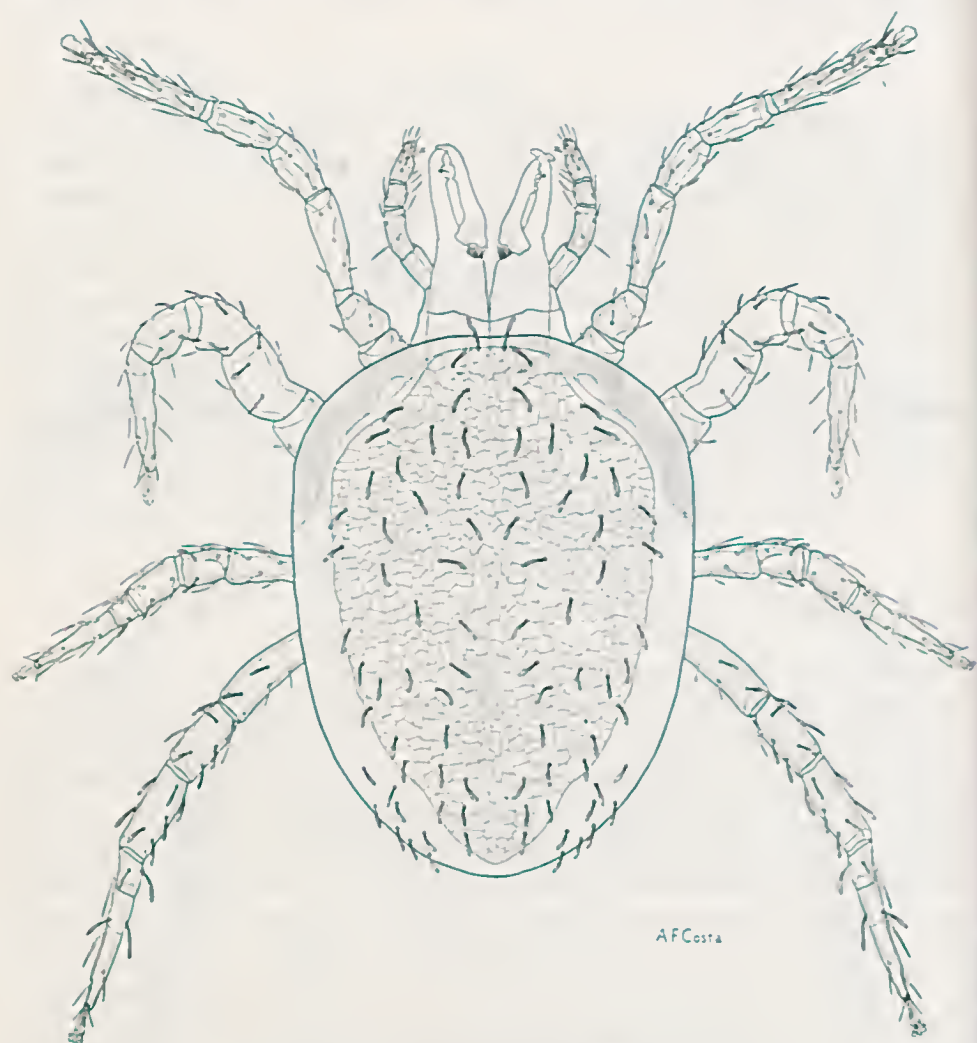



Fig. 2 — *Cosmolaelaps bregetovae* sp. n.

tares, com cêrca de 10 micra apenas, com a cerda implantada fóra delas. Placa genital com retículo largo, com 165 micra de maior largura, moderadamente dilatada de bordo posterior arredondado e cerda genital curta, com

38 micra. Placa anal com 95 micra de comprimento por 95 de maior largura, piriforme alargada; anus a 30 micra do bordo; cerdas pares pouco atrás do nível do meio do anus, com 32 micra. Plaquetas metapodais inconspícuas. Peritrema alcançando a coxa do primeiro par. *Peritrematalia* muito largas, prolongados atrás dos estígmas, com superfície reticulada e pontilhada, emergindo na face dorsal na altura da coxa II sob a forma de um escudete lateral muito característico, separado do escudo dorsal por um espaço progressivamente mais estreito para a frente, até que se funde com êle num ponto para trás do segundo par de cerdas frontais (F 2 de Zachvatkin). Superfície descoberta com poucas cerdas, que são normais até o nível do bordo anterior da placa anal e são espatuladas daí para trás.

Face dorsal. — Escudo dorsal de superfície com aspecto escamoso, de escamas por sua vez reticuladas, estreitando-se para trás, quase atingindo o nível do polo posterior do opistossoma, deixando descoberta margem lateral progressivamente mais larga, medindo 720 micra de comprimento por 470 micra de maior largura. Cerdas do escudo dorsal achatadas, espatuladas, subiguais, de comprimento variando entre 33 e 42 micra. O número total de cerdas é igual ao de *Laelaps*, isto é, alcança 39 pares, com idêntica distribuição. Tectum com depressão mediana e duas laterais em retículo de malha larga.

Patas. — Na sua descrição do *Hypoaspis macrocheles* chama Vitzthum a atenção para o comprimento grande das pernas, indicador de celeridade de movimentos. Na presente espécie as patas do 1.º e 4.º pares são as mais longas com aproximadamente 770 e 840 micra, respectivamente. A pata II é a mais robusta e a pata III a mais curta. A superfície é de aspecto mamilonado, exceto nos tarsos, que são lisos. As cerdas têm aspecto normal, só no tibia e tarso IV tendo sido vistas algumas cerdas de aspecto semelhante ao das do escudo dorsal, isto é, tendendo para forma espatulada. A pata I parece mais utilizada como órgão sensorial, hipótese a favor da qual falam os pelos do tufo tarsal.

Gnatossoma. — O comprimento, da base das maxilicoxas ao ápice dos palpos, alcança 430 micra. Coxas maxilares com as cerdas habituais, das quais a média interna é a maior, medindo 95 micra, vindo em seguida a anterior com 85 micra, sendo a externa a menor, apenas alcançando 54 micra. *Rima hypopharingis* com 5 séries de 5 a 8 dentículos. Os *corniculi* constituem uma das peças que mais chamam a atenção, devido ao desmensurado comprimento, que atinge 100 micra, apontando para frente como lanças bem quitinisadas porém não muito escuras. Labro fino, longo e piloso. Mandíbulas lembrando pelo seu comprimento as de *Veigaia*, com dedos muito longos, de cêrca de 165 micra, mas não alargados. Dedo fixo com dois dentes situados na metade anterior e de tamanho pequeno, com *pilus* curto e não dilatado. Dedo móvel com 2 dentes pequenos anteriores e *pulvillum* de pseudo-cerdas muito curtas.

Femur e genual muito fortes e longos, medindo 140 por 80 micra de maior largura do femur.

A peça que corresponde aos *stylli* acha-se por tal forma aderente ao bordo externo dos *corniculi* que com êle parece fundida, só raramente se percebendo a dissociação.

Descrição do holótipo fêmea N.º 3481, capturado sôbre o rato *Oxymycterus doris*, a 15. XII. 54, em Valleabajo, a 1500 métros de altitude, na Bolívia. Três paratipos fêmeas N.º 3481 capturados com o holótipo. Macho e formas jovens desconhecidos. O fato de ter sido encontrado sôbre um rato exigiria, talvez, comprovação, para ter segurança de não se tratar de captura feita no ninho desse roedor. A forma das mandíbulas indica natureza predadora, segundo Vitzthum. A possibilidade de tratar-se de caso de fagofalia, isto é, de encontrar-se sôbre o hospedeiro a procura de outros artropodes que lhe servissem de prêsa, é outra hipótese discutível. *Atricholaelaps (Ischyrolaelaps) glasgowi* e *Eulaelaps halleri* foram encontrados no mesmo exemplar de rato. Temos satisfação em dedicar a nova espécie à profunda conhecedora da acarofauna oriental, Nina Bregetova, autora de trabalhos modelares sôbre os *Gamasoidea*.

Gênero *Eubrachylaelaps* Ewing 1929

Eubrachylaelaps rotundus Fonseca 1936

Fica estendida à Bolívia a distribuição geográfica desta espécie brasileira, aliás já assinalada no Perú por Furman, sôbre *Akodon mollis orophilus*, em 1955 e por Fonseca em 1960 em *Akodon mollis, Proechimys decumanus, Oryzomys longicaulatus*, e *O. xanthacolus*. Algumas diferenças relativas às cerdas marginal posterior e à marginal que a esta se segue no escudo dorsal (M 11 e M 10 de Zachvatkin), que medem respectivamente 126 micra e 98 micra e ao menor tamanho das verticais posteriores, que apenas atingem 56 micra, e das cerdas do primeiro par submediano (D1 de Zachvatkin), com 12 micra, não parecem justificar reconhecimento de uma nova espécie. *E. rotundus* foi encontrado em parasitismo de *Oecomys mamorae* a 21.X.54 em Buen Retiro e sôbre *Akodon mollis* a 15.XII.54 em Novillos, tomando os lotes respectivamente os N.os 3444 e 3472 em nossa coleção.

Gênero *Gigantolaelaps* Fonseca 1939

Gigantolaelaps barrerai sp.n.

Figs. 3 a 6

É espécie que, pelas suas pequenas dimensões, se aproxima de *Gigantolaelaps canestrinii* Fonseca, que como ela tem cêrca de 1500 micra e apresenta espinhos fortes no tarso II. As diferenças principais entre as duas espécies são as seguintes: em *Gigantolaelaps barrerai* sp.n., as cerdas posteriores das

maxilicoxas são muito mais fortes do que as restantes, ao passo que em *G. canestrinii* elas e as médias internas são subiguais; na espécie da Bolívia os espinhos do tarso II são ainda mais fortes, tendo o maior 90 micra x 24 micra, medindo o tarso II, sem o pretarso, 162 micra, ao passo que na espécie brasileira êsse espinho tem 72 x 14 micra e o pretarso mede 120 micra; além disso, na espécie boliviana o espinho anterior da coxa III é bem mais longo que o posterior e o

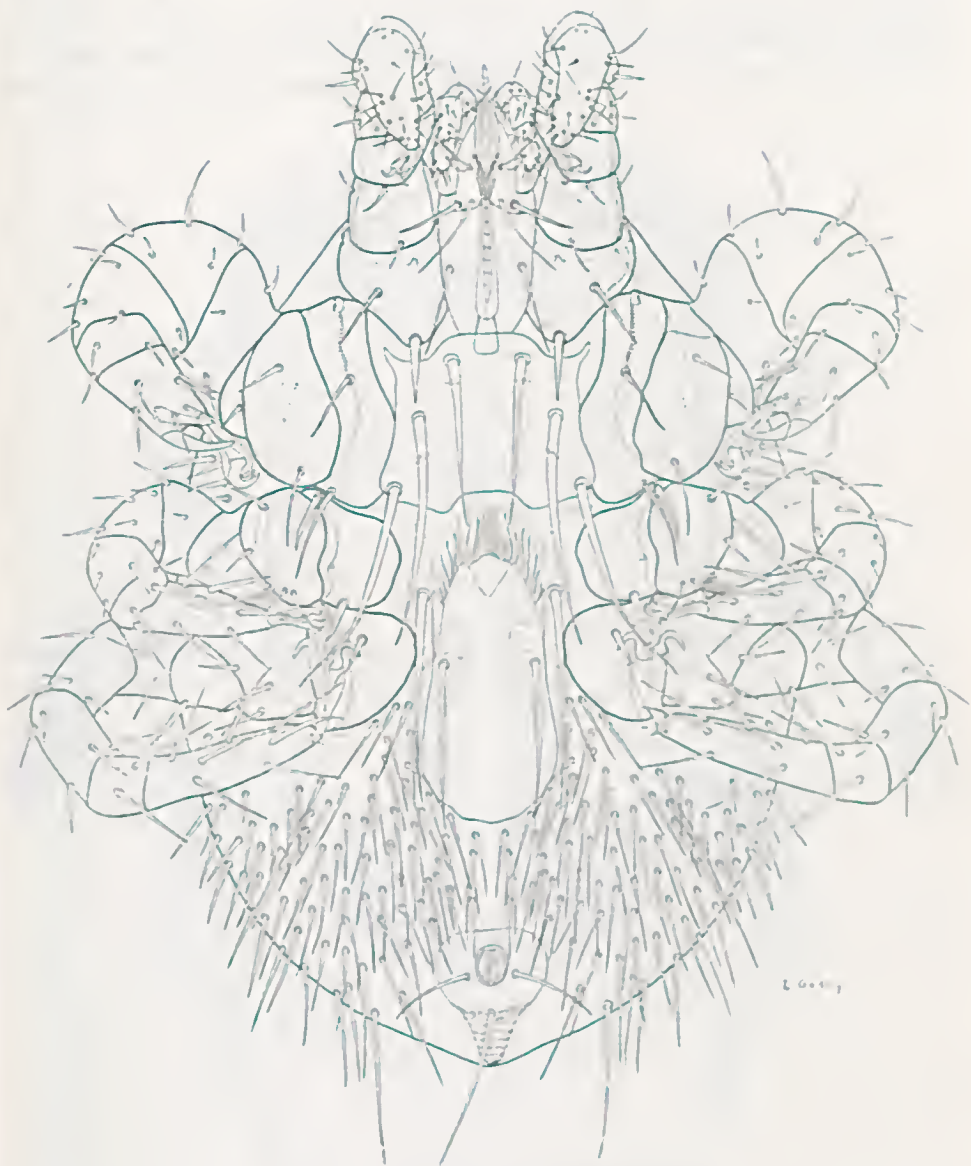



Fig. 3 — *Gigantolaelaps barrerai* sp. n.

espinho da coxa IV é igual ao posterior da coxa III, ao passo que na espéci
brasileira o espinho anterior da coxa III é pouco maior do que o da coxa IV
A existência de espinhos muito fortes no tarso II aproxima ambas as espécie
do *Gigantolaelaps brachyspinosus* Fonseca 1939, tendo a espécie boliviana, ta

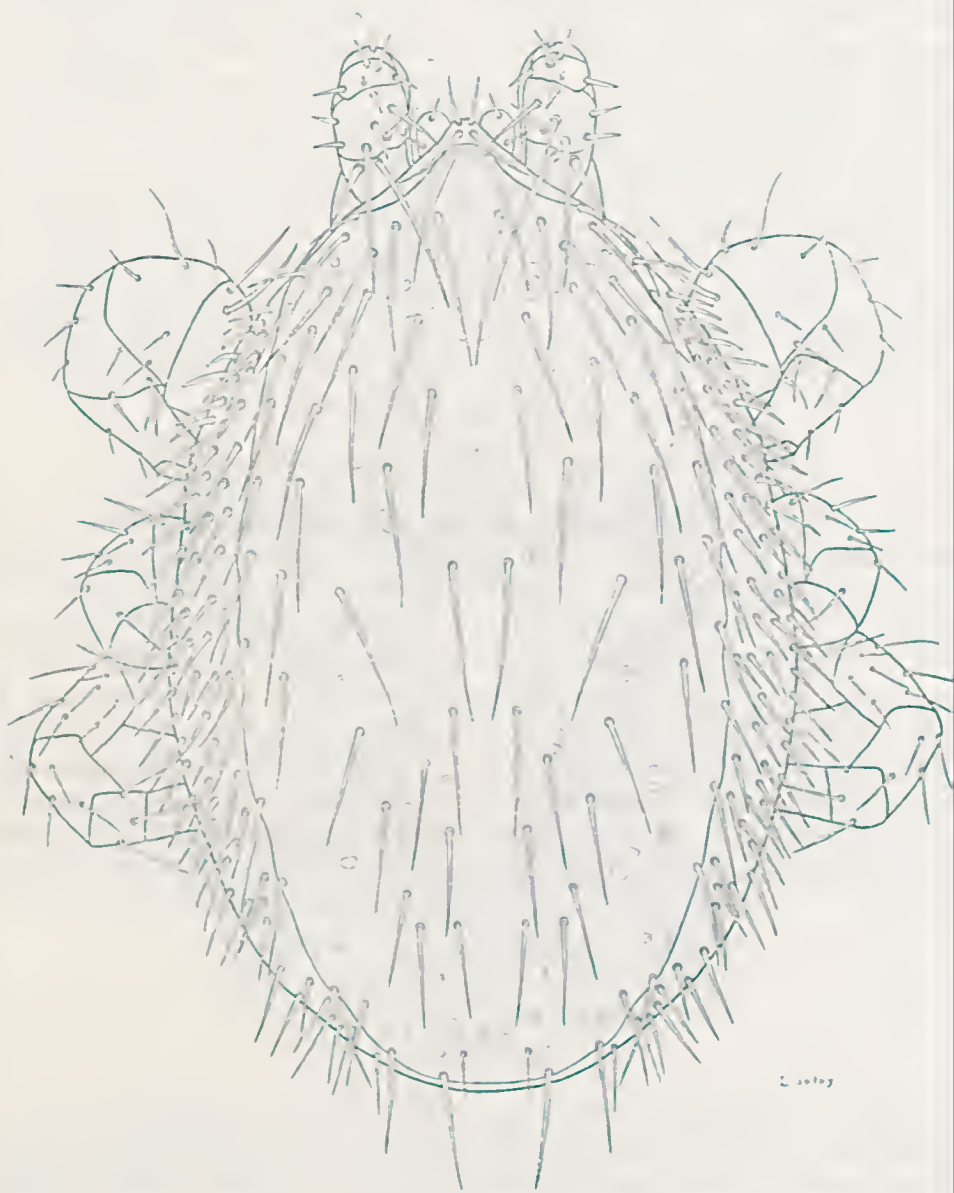



Fig. 4 — *Gigantolaelaps barrerai* sp. n.

como *G. brachyspinosa*, espinhos do tegumento dorsal muito fortes no propodossoma.

Descrição da fêmea.

Idiossoma. — Mede 1330 micra de comprimento por 925 micra de maior largura, tem extremidade anterior afilada e posterior larga, com ombros apenas acusados.

Face ventral. — Base do tritoesterno recoberta pela projeção mediana da placa esternal, não sendo vista a porção basal das suas hastes no holótipo, sendo a porção distal filamentosa. Esternal com forte projeção anterior, de

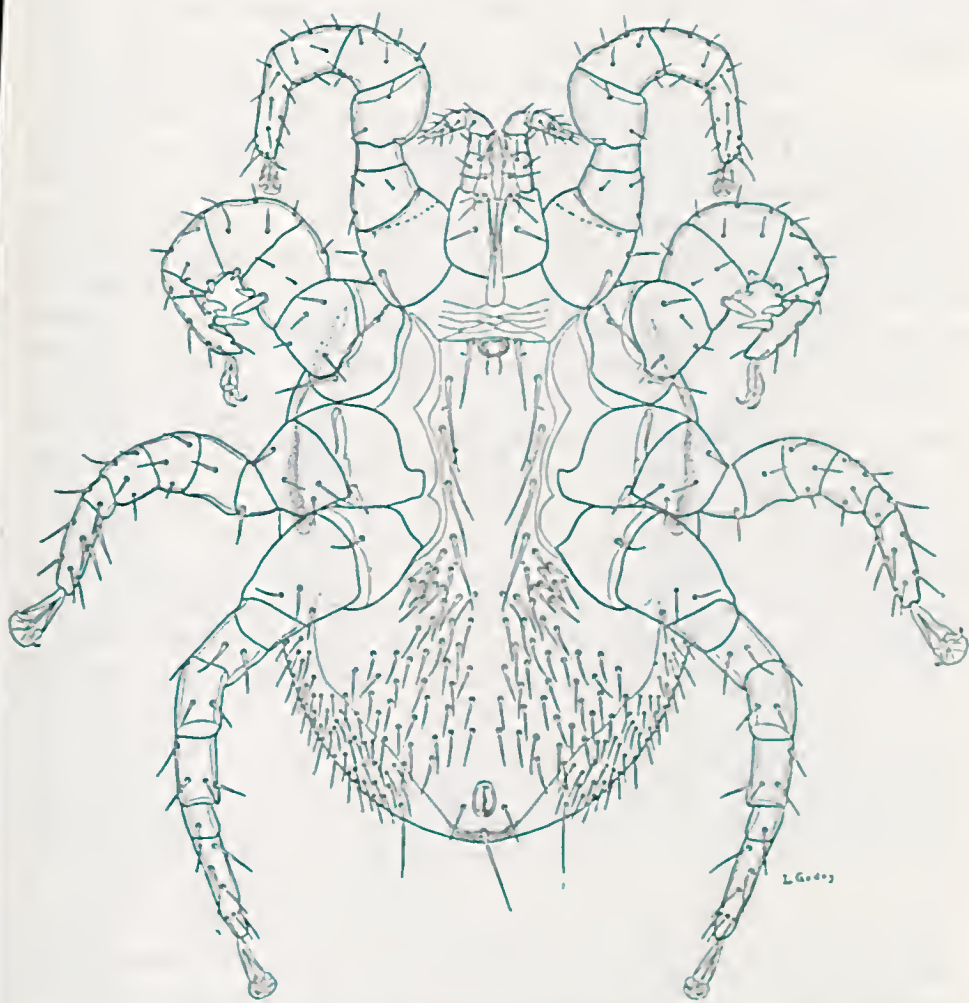



Fig. 5 — *Gigantolaelaps barrerai* sp. n.

140 micra de largura, nos extremos da qual ficam implantadas as longas cerd[as] anteriores, que ultrapassam de muito o comprimento da placa. A estern[al] mede 210 micra de comprimento por 266 micra de menor largura ao nível d[as] cerdas médias e é muito fortemente quitinizada, embora não tenha bordos lat[e]rais tão espessos quanto as do genótipo, *G. vitzthumi*. O bordo posterior te[m] concavidade mediana, sendo, ao contrário, saliente lateralmente. Cerdas ant[e]riores com 28 micra, médias com 266 micra e posteriores com 280 micra, tôd[as] flexíveis e de ápice muito afilado. As placas metaesternais são de quitinizaç[ão] fraca, acompanhando a curvatura da coxa III e atingindo a esternal; su[as] cerdas medem 235 micra. A placa genital e levemente expandida, com mai[...]

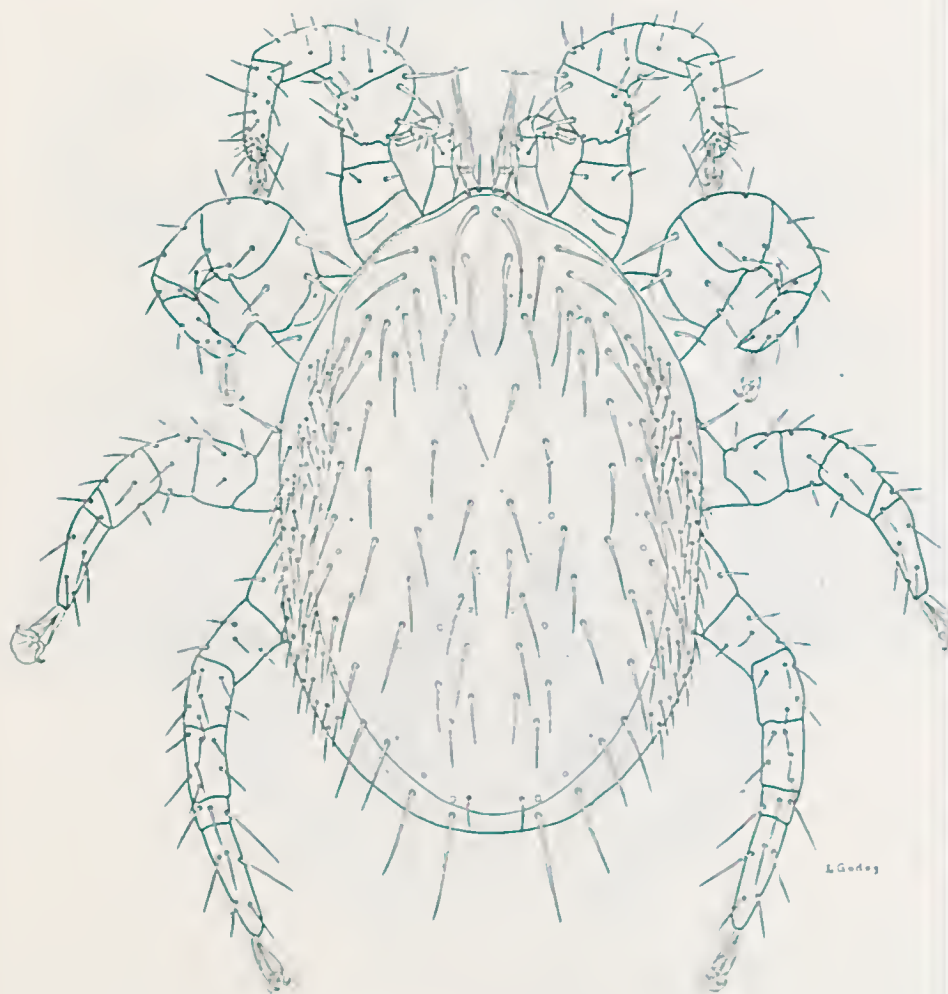



Fig. 6 — *Gigantolaelaps barrerai* sp. n.

largura de 168 micra, medindo as cerdas genitais 224 micra, sendo bem mais finas desde a base do que as esternais e metaesternais. A placa anal fica a cêrca de 165 micra do bordo da genital, medindo 180 micra de comprimento por 168 micra de maior largura e tem conformação piriforme larga. O anus fica a 20 micra do bordo anterior e mede 58 micra de comprimento. As cerdas pares ficam muito mais aproximadas dele do que o bordo da placa, entre o nível do meio e do polo anterior do anus, medindo 98 micra o comprimento da cerda impar. Placas inguinais não foram vistas. As cerdas da superfície ventral, em número de cêrca de 100, são longas, medindo a mais curta 112 micra e a mais longa 224 micra. Próximo do bordo externo tais cerdas se transformam em verdadeiros espinhos. Estigmas, no intervalo entre as coxas III e IV, relativamente pequenos; peritrema visto até o bordo posterior da coxa I; peritrematalia relativamente estreitas, aparentemente sem prolongamento posterior e parecendo atingir o bordo anterior da coxa I.

Face dorsal. — Escudo dorsal pràticamente do comprimento do idiossoma, medindo cêrca de 1290 micra por 756 micra de maior largura ao nível do quarto par de coxas, de polo anterior afilado e com faixas de quitinisação mais forte, que atingem a base do primeiro par de cerdas submedianas, estreitando-se dos lados. A restante área é elíptica bastante regular, com polo posterior arredondado, de superfície reticulada e bordos laterais muito ligeiramente sinuosos. Áreas areoladas são observadas, com disposição alongada, não sendo as areolas confluentes. Chamam logo a atenção as cerdas esparsas muito longas. A cerda vertical anterior (F1 ou i 1) mede 98 micra e a posterior (F3 ou i3) 224 micra; as do primeiro par submediano (V ou S2) medem 252 micra, tendo a menor cerda do escudo, excetuadas as duas verticais anteriores (F1 ou i1) e a pequena submediana posterior (S8 ou J5), 147 micra. Esta última mede 70 micra e o par terminal posterior 182 micra. A superfície dorsal descoberta é densamente revestida de cerdas, muito fortes na frente, onde são verdadeiros espinhos, e muito mais finas atrás, o que também é boa característica da espécie. As notações aqui empregadas entre parêntesis, para as cerdas do escudo dorsal são de Zachvatkin (1948) e Bregetova (1956) e a de Hirschmann (1957).

Gnatossoma. — Cerdas das maxilicoxas muito características devido à maior robustez e comprimento das posteriores, que medem cêrca de 130 micra, tendo as médias internas, bem mais finas, 118 micra, sendo de tôdas a menor a anterior, que tem 60 micra. Os *corniculi* são muito robustos. Outros detalhes não puderam ser vistos no holótipo.

Patas. — As patas do 4.° par não são alargadas e são as mais longas, sofrendo as do 2.° par grande alargamento. As coxas do 1.° par têm duas cerdas piliformes subiguais de cêrca de 85 micra, das quais a posterior mais robusta. A coxa II tem cerda anterior relativamente curta e encurvada e

cerda posterior de 155 micra, mal atingindo o meio da coxa III, podendo portanto a espécie ser incluida entre as que têm tal cerda relativamente curta, como *G. oudemansi* Fonseca, *G. gilmorei* Fonseca e *G. brachyspinosus* Fonseca; o bordo distal é denteado na região anterior. Coxa III com cerda espiniforme longa anterior, com cêrca de 90 micra, e espinho posterior, de 55 micra por 15 micra de maior largura, pouco à frente da implantação. Coxa IV com cerda espiniforme de 65 micra por 11 micra de maior largura, sendo portanto robusta. Genual e femur I cada qual com uma cerda dorsal robusta muito mais longa do que as restantes, que são espiniformes fortes; nos artículos homologos das outras patas as cerdas de igual localização são piliformes, fracas, portanto. Tarsos muito característicos. O tarso I só tem pelos finos. Ao contrário disso, o tarso II é calcarado, apresentando dois espinhos, um maior subapical, no bordo dorsal, com 90 micra por 24 micra de maior largura e um menor, já na face ventral, com 75 micra por quase 20 micra de largura. O tarso III tem cerdas muito robustas e largas e o tarso IV cerdas rígidas e longas, porém finas. Sòmente as garras do tarso I são fracas.

Descrição do macho

Os machos desta espécie parecem existir em proporção elevada, pois no lote tipo, ao lado de único exemplar fêmea holótipo, havia três machos. Que se trata do sexo oposto da mesma espécie parece não haver dúvida, pois lá estão o tarso II com os dois espinhos homólogos dos da fêmea, embora não tão fortes, e a cerda posterior das maxilicoxas mais robustas. Não se pense que as fêmeas são, por isso, mais masculinizadas do que os machos, pois êstes apresentam calcar no femur, genual e tíbia, tal como as fêmeas de *Androlaelaps* Berlese. Aliás é característico dos *Gigantolaelaps* serem os machos de morfologia mais delicada do que as fêmeas. Até agora são conhecidos e desenhados apenas os machos das espécies *G. gilmorei* Fonseca, *G. goyanensis* Fonseca, *G. vitzthumi* Fonseca, que descrevemos ao erigir o gênero, e o de *Gigantolaelaps cricetidarum* Morlan 1951, pois o macho representado nas figs. 26 e 27 do mesmo trabalho de 1939 como pertencente ao *G. butantanense* não corresponde de todo à essa espécie, como aliás se deduz da sua descrição, tendo sido reproduzido por equívoco o macho ainda não descrito de *Laelaps lateventralis* Fonseca.

Idiossoma. — Bem menor do que o das fêmeas, com 1120 micra de comprimento por 660 micra de maior largura, ligeiramente ovoide por ter o polo anterior acuminado, com ombros, pouco alongado atrás.

Face ventral. — Placa holoventral com ligeira projeção mediana no bordo anterior, onde fica o órgão masculino, junto do qual ficam as cerdas esternais anteriores que medem 140 micra, separadas por intervalo de 80 micra. As cerdas médias e as posteriores têm 154 micra e as metaesternais 140 micra. As

cerdas genitais têm 126 micra. A região genito-ventral é muito expandida, ocupando pràticamente todo o histerossoma, com largura máxima de 500 micra, tendo cêrca de 28 cerdas de cada lado, a mais curta com 56 micra e a maior com 98 micra, havendo um pequeno grupo de cêrca de 5 no ângulo interno da coxa IV. As cerdas anais pares têm 72 micra e a impar 154 micra. A base do tritoesterno não é recoberta pela placa esternal, parecendo suas ramificações só existirem na metade distal. O peritrema, com *peritrematalia* muito estreita, termina ao nível da região posterior da coxa II.

Face dorsal. — O escudo dorsal deixa margem estreita descoberta e lembra de fato o da fêmea, pois as cerdas são igualmente esparsas e longas.

Gnatossoma. — As cerdas posteriores das maxilicoxas são, como na fêmea, as mais robustas, mas parecem não ser as mais longas. Cerdas anteriores e médias internas mais longas, subiguais. Dedo fixo da mandíbula com 160 micra, canaliculado em tôda extensão.

Patas. — Pata II, tal como na fêmea, muito alargada, sendo a pata I a mais fina. Tôdas as coxas com cerdas, sem espinhos, sendo a posterior da coxa II a mais longa e a posterior da coxa III a mais robusta. Femur II com esporão fortíssimo, ventral. Genual e tíbia II cada qual com um espinho curto e forte ventral. Tarso II com dois espinhos muito fortes no bordo, em situação pouco menos distal do que os homólogos da fêmea. Tarsos terminando com *pulvilli* e garras que só no tarso I são fracas. Esta é, por enquanto, a única espécie do gênero cujos machos apresentam patas calcaradas, o que facilita a identificação da espécie, principalmente se for confirmada a proporção relativamente elevada de machos.

Descrição de um holótipo fêmea e um alótipo macho, N.º 3465, montados em lâminas separadas. O alótipo é o exemplar em posição ventral, havendo na mesma lâmina um macho em posição dorsal. Lote tipo capturado pelo Dr. J. M. de la Barrera, a 30.X.54, em Buen Retiro, sôbre *Dasyprocta variegata*. Além do lote tipo há ainda dois outros lotes obtidos pelo mesmo capturador: o de N.º 3455, encontrado a 26.X.54 sôbre *Graomys griseoflavus*, em Buen Retiro, constando de fêmeas, machos e ninfas e o de N.º 3511, obtido sôbre *Oryzomys* sp. a 12.VII.55, em Gutierrez, Bolívia, ao lado de *Ischnolaelaps* sp. e de *Schistolaelaps mazzai*. A espécie dedicada ao capturador do material.

Gigantolaelaps goyanensis Fonseca 1939.

Também sôbre *Graomys griseoflavus*, foi efetuada, em Buen Retiro uma captura de representante deste gênero com caractéres da espécie em questão, recebendo o lote o N.º 3454.

Gigantolaelaps oudemansi Fonseca 1939.

Desta espécie tão característica devido às suas dimensões pequenas, relativamente às das restantes espécies do gênero, e à hipertrichose da placa esternal, apenas foi feita a captura do lote 3449 sôbre *Hesperomys muriculus* de Buen Retiro. Este é o único país, além do Brasil, de onde a espécie foi até agora obtida. As capturas brasileiras são, além de São Paulo, de onde a espécie foi descrita, do Pará, do Ceará, de Goiás e de Santa Catarina. Tais proveniências demonstram a grande dispersão da espécie, quer de norte a sul, quer de leste a oeste do Brasil.

Gigantolaelaps wolffsohni Oudemans

Espécie com caractéres idênticos aos desta foi capturada duas vêzes, correspondendo aos nossos lotes N.os 3459 e 3505, respectivamente sôbre *Graomys griseoflavus*, em Floripondio e *Hesperomys muriculus*, em Cabezas. A mesma espécie ocorre em Brusque, Santa Catarina, Brasil, onde foi capturada sôbre rato silvestre por Silveira Fontes, tendo o material sido doado ao autor pelo prof. Henrique Aragão.

Laelaps castroi Fonseca 1959.

É espécie que no Brasil nunca teve sua presença verificada ao sul do Estado da Bahia, apenas tendo sido obtida no nordeste brasileiro. Da Bolívia vieram vários lotes que tomaram os seguintes N.os: 3458, de *Graomys griseoflavus* de Buen Retiro e 3466, de *Dasyprocta variegata* de Buen Retiro. O encontro da espécie sôbre uma "Cotia" merece referência, pois é estranhavel ver um *Laelaps, sensu strictu*, em outro hospedeiro que não rato, mesmo tratando-se de roedor.

No nordeste do Brasil a espécie foi capturada sôbre *Oryzomys eliurus*, *Oryzomys subflavus*, *Cercomys cercomys inermis*, *Zygodontomys pixuna* e "Rato Calunga".

Gênero *Mysolaelaps* Fonseca 1939.

Mysolaelaps heteronychus Fonseca 1959.

É a espécie mais recentemente descoberta dêste curioso gênero de *Laelaptidae* constituído por parasitas exclusivos de ratos. Caracterisam-na as grandes dimensões, comparáveis às dos menores *Gigantolaelaps* Fonseca e dos *Macrolaelaps* Ewing e a curiosa anomalia de uma só das garras tarsais dos três pares posteriores de patas, a garra ventral, que é hipertrofiada, disparidade esta que não me consta ocorrer em qualquer outro Ácaro. Até hoje *Mysolaelaps heteronychus* apenas tinha sido obtido de ratos do nordeste do Brasil, não ocorrendo no sul dêste país, nem tendo sido até hoje assinalado no seu oeste.

Constituiu, por isso, motivo de surprêsa encontrá-lo no oriente boliviano, onde foi capturado pelo Dr. de la Barrera que nos remeteu material dos seguintes hospedeiros:

Lote N.º 3469 — *Hesperomys muriculus* de Água Hedionda.

Lotes N.º 3496 e 3500 — *Graomys griscoflavus* de Floripondio (1530 metros de altitude) e de Água Hedionda, respectivamente.

Tal como nos numerosos lotes que estudamos do nordeste brasileiro, também neste material não foi encontrado macho algum, o que sucede igualmente às outras duas espécies, *M. parvispinosus* Fonseca 1936, descrita originalmente de São Paulo, muito comum no nordeste do Brasil, já vista em 1959 no Perú por Furmann, e agora registrada na Bolívia, e *M. microspinosus* Fonseca 1936, apenas conhecido de poucos lotes de São Paulo e Minas Gerais. Ainda não é possível decidir se os machos não são encontrados por não frequentarem os roedores e sim apenas os seus ninhos, ou se de todo não existem, ocorrendo partogenese telitoca. O fato de também não serem encontradas formas imaturas sôbre os hospedeiros faz supor que os machos, tal como estas, permaneçam nos ninhos dos ratos.

Mysolaelaps parvispinosus Fonseca 1936.

Descrita originalmente do Estado de São Paulo, Brasil, do hospedeiro tipo, que agora sabemos ser o *Oryzomys eliurus* Wagner, foi, esta espécie, posteriormente capturada sôbre o mesmo rato em Terezopolis, Estado do Rio de Janeiro, pelo Dr. A. E. Trindade, do qual recebemos o material, e no nordeste brasliciro, onde se mostrou muito frequente, a ponto de ter sido colhida sôbre 14 espécies de ratos, um cavídeo e um didelfídeo, referidos em outro trabalho onde é estudada a fauna acarológica do nordeste brasileiro. Agora fica registrada sua ocorrência também na Bolívia, onde foi capturada uma só vez sôbre *Oecomys mamorae*, a 21.X.54, na localidade de Buen Retiro, ao lado de exemplares de *Ischnolaelaps* sp., *Schistolaelaps mazzai* (Fonseca) e de ninfas de *Ixodes* sp. Das espécies do mesmo gênero é a de mais dilatada distribuição geográfica.

O gênero *Mysolaelaps* Fonseca 1936, embora fàcilmente reconhecível, é de diagnose difícil formular, pois os caracteres sumários utilizados em chaves para distinguir os gêneros de *Laelaptidae* fa-los-iam concidir com o gênero *Laelaps* Koch. Tal como êste, apresenta, em geral, quatro cerdas na placa gênito-ventral. Esta é muito dilatada, como sucede a algumas espécies de *Laelaps*, e tem ângulos arredondados, sendo reto ou ligeiramente côncavo o bordo posterior, mas nunca convexo. O colorido castanho das áreas quitinisadas, a ausência de espinhos, as cerdas finas e muito pequenas para o tamanho do ácaro, com raras exceções, a placa anal muito alargada e relativamente curta, são caracteres comuns às espécies dêste gênero, que se distinguem ainda

de *Laelaps* Koch por terem menos de 39 pares de cerdas no escudo dorsal e de *Hyperlaelaps* Zachvatkin por não terem cerdas espiniformes como nêste. *Mysolaelaps parvispinosus* é a espécie mais frequente e *Mysolaelaps microspinosus* a mais rara. É provável que o *Laelaps rothshildi* Hirst 1914, da qual consideramos sinônimo *Laelaps melomys* Womersley 1937, também pertença a êste gênero; é pelo menos o que se deduz da descrição e da gravura apresentada por Womersley. Devido, entretanto, à diversidade de regiões zoogeográficas, conviria, antes de garantir a sua situação no gênero, examiná-la, não confiando demasiadamente na descrição. Isto é tanto mais verdadeiro quanto na mesma fauna australiana ocorre a espécie *Laelaps finlaysoni* Womersley 1937, também caracterisada por acentuada microtriquia, mas cujo macho, ao contrário dos de *Mysolaelaps*, é conhecido. Não deixa de ser curioso que um gênero caracteristicamente neotrópico tenha representantes australianos.

Eulaelaps halleri (Fonseca 1960)

Recentemente R. Domrow, do Queensland Institute of Medical Research, chamou nossa atenção para o fato de que em *Eulaelaps stabularis* o trocanter do palpo tem também o órgão sensorial que descrevemos em *Eulaelaps vitzthumi*, *Rhinolaelaps halleri* e *Rhinolaelaps blumenthali*, devendo, portanto, o gênero *Rhinolaelaps* Fonseca ser considerado sinonimo de *Eulaelaps*.

Descrição do macho e redescrição da fêmea

Figs. 7 e 8

Espécie um pouco menor do que o genótipo, bem quitinizada, com pilosidade fraca e não tão densa quanto a do *E. vitzthumi*, de patas finas e mandíbulas muito robustas. Ao contrário do que sucede ao genótipo, aqui sòmente a fêmea é conhecida. Foi também encontrado um exemplar macho, portador do mesmo curioso órgão tarsal. É espécie descrita originalmente do Perú onde foi encontrada sôbre *Mus musculus*, segundo o capturador.

Fêmea.

Idiossoma — De contôrno muito regular, perfeitamente oval, com o polo anterior estreito, sem ombros, medindo 1100 micra de comprimento por 770 micra de maior largura logo atrás do quarto par de coxas.

Face ventral. — Tritoesterno dividido e piloso desde a base, com pêlos distanciados uns dos outros. Placa esternal reticulada, mais larga do que longa, medindo 130 micra de comprimento na linha média a 180 micra de menor largura, com três pares de cerdas lisas, as anteriores um pouco menores e as médias e posteriores subiguais, com cêrca de 100 micra. O bordo anterior, pràticamente reto, confunde-se com a pre-esternal, de quitinisação mais fraca, que termina no bordo do gnatossoma, incluindo o tritoesterno. O bordo pos-

terior é escavado, ficando as cerdas posteriores a certa distância dele e dos bordos laterais. Meta-esternais pouco diferenciadas, com cerdas de comprimento igual ao da posterior da esternal. Gênito-ventral com expansão máxima pouco atrás da metade do seu comprimento, onde mede 460 micra de largura

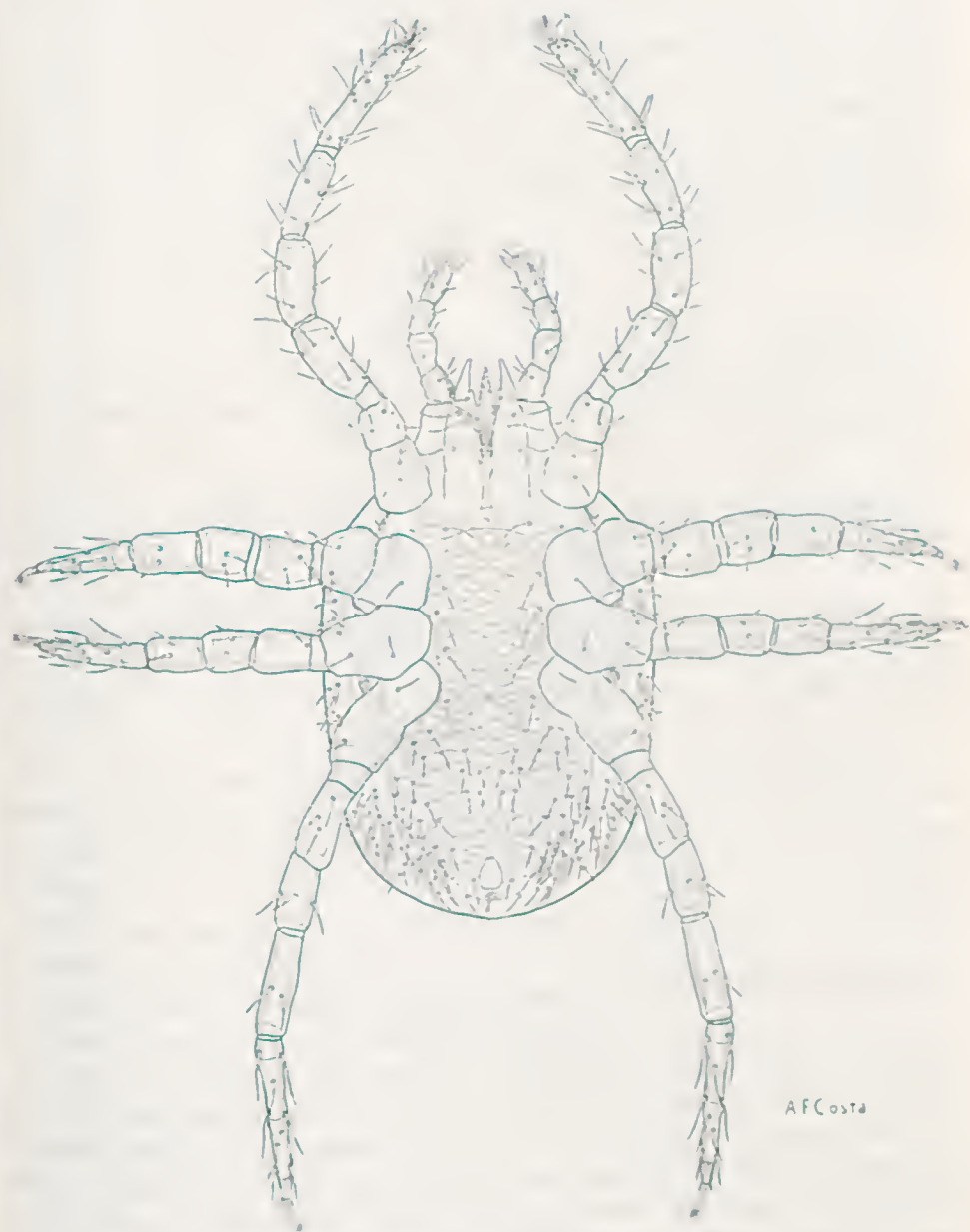



Fig. 7 — *Eulaelaps halleri* (Fonseca 1960)

e é um tanto angulosa. O bordo posterior, que é de observação dificultada por uma prega do tegumento existente nos dois eótipos, parece levemente côncavo. A superfície é de retículo de largas malhas transversais. Há cêrca de 10 pares de cerdas marginais nesta placa, além do par genital, dos quais três

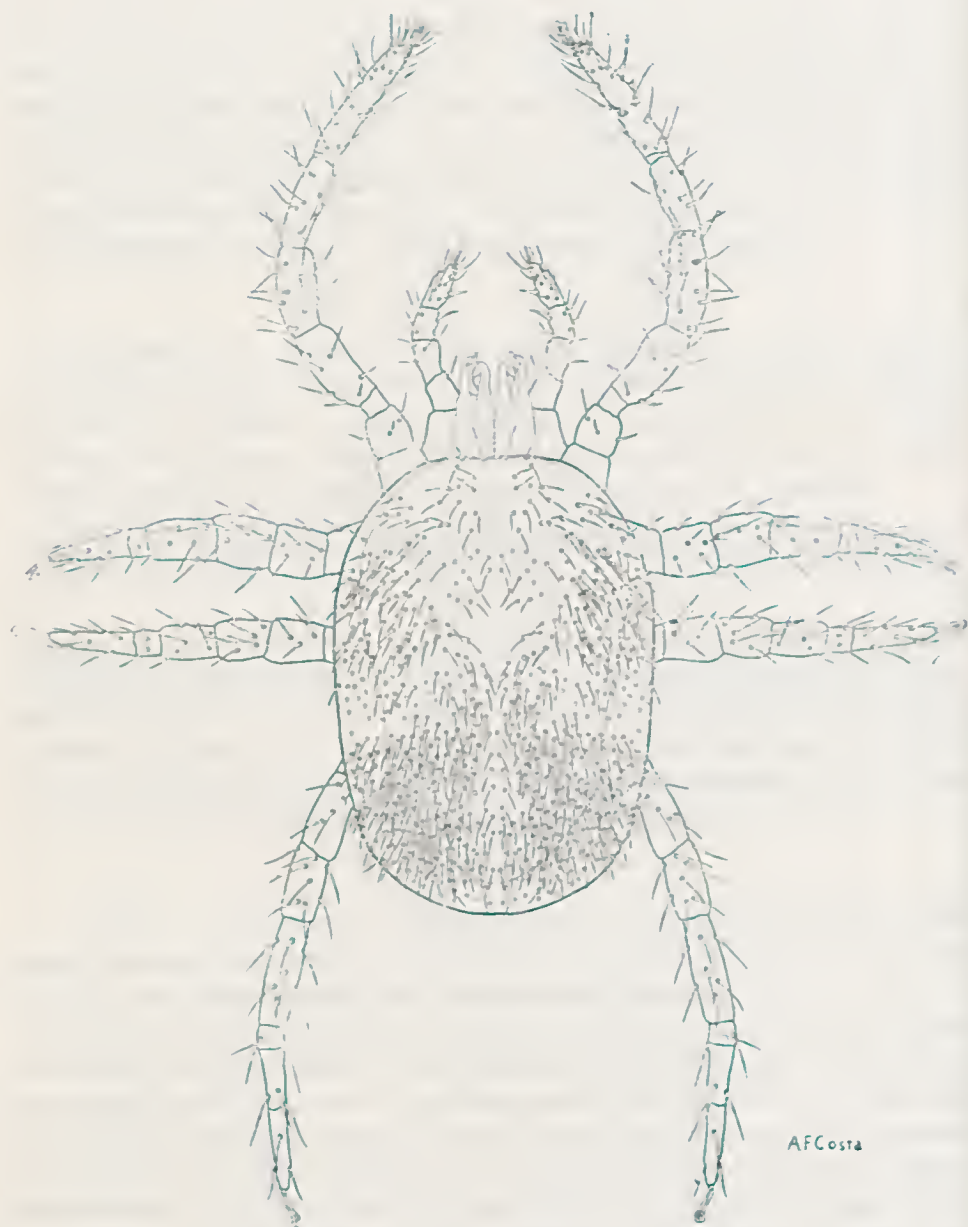



Fig. 8 — *Eulaelaps halleri* (Fonseca 1960)

no bordo posterior, em sua maioria lisas, mas algumas providas de farpa. A superfície da placa apresenta mais cêrca de 15 pares de cerdas lisas. Placa anal a cêrca de 15 micra do bordo da gênitoventral, com 126 micra de comprimento por 154 micra de maior largura na frente, com anus situado a pequena distância do bordo anterior e cerdas pares de 75 micra mais ou menos, entre o polo posterior e o meio do anus, bem mais aproximadas dele do que dos bordos da placa; a cerda posterior está fraturada nos dois coótipos. Placas inguinais de conformação ovoide alongada, com 112 micra de comprimento por 56 micra de maior largura, de polo posterior afilado, com retículo de cêrca de sete malhas largas. Restante superfície ventral moderadamente pilosa, sendo farpeadas as cerdas dos bordos e geralmente lisas as da superfície. Estígmas ao nível do intervalo entre as coxas III e IV e peritrematalia indo do bordo posterior da coxa IV ao bordo anterior da coxa I, com peritrema atingindo a coxa I.

Face dorsal. — Escudo praticamente do comprimento do idiossoma, deixando lateralmente, ao nível da coxa II para trás, estreita faixa descoberta. A superfície apresenta retículo mais aparente na região mediana. Embora densamente piloso, não apresenta revestimento tão abundante quanto o do *E. vitzthumi*. O único par de cerdas verticais é o mais robusto de todos, medindo 70 micra, tal como as cerdas mais longas. Não há cerdas posteriores mais longas, nem par submediano mais curto como em *Laelaps*, sendo tôdas as cerdas subiguais e geralmente lisas.

Patas. — As patas deste ácaro são tôdas finas, apenas as do segundo par são ligeiramente mais robustas. Ao passo que as coxas do primeiro par são relativamente longas, as restantes são muito encurtadas, constituindo apenas estreita faixa, com as cerdas em situação e número normais, tôdas finas. O tarso do primeiro par, com 290 micra, é muito longo. Maior ainda é o do quarto par, que mede 335 micra. Tôdas as patas terminam em *pulvilli* com duas garras fracas. As cerdas da pata I são mais fracas do que as das restantes.

Nos tarsos nada existe que lembre um órgão sensorial do tipo do existente no palpo.

Gnatossoma. — Graças à morfologia característica do gnatossoma foi possível reconhecer êste pequeno grupo de *Eulaclaps*.

As maxilicoxas, cujas cerdas são cerdas longas, finas e lisas, sendo a menor a externa mediana, terminam em *corniculi* de grande robustez. A *rima hypopharyngis*, larga, apresenta onze séries de dentículos. Os palpos têm um primeiro artículo um pouco mais longo e ostentam desde a base do seu bordo interno até as proximidades do ápice o órgão sensorial capsulado característico do gênero e já descrito em *Eulaclaps vitzthumi*. Este órgão, que não chega

a tomar tôda a largura do artículo. é constituido por uma cápsula alongada de parede quitinosa e espessa, dividida por septos largos, de estrutura igual à da cápsula, em cinco câmaras de tamanho progressivamente decrescente para o ápice, parecendo isolados do exterior por fina membrana. Na altura das duas primeiras câmaras há, do lado dorsal, um folheto membranoso externo que parece terminado em ponta dirigida para frente e para dentro, também já visto em *E. vitzthumi*, cuja projeção no desenho desta espécie dá o aspecto de um espinho. No interior das câmaras não são vistos pêlos sensoriais tais como os descritos por Schulze no órgão de Haller dos *Ixodides*, também não havendo os dois tufos de pêlos anteriores e posteriores, como ocorre naquele órgão, nem quaisquer vestígios da secreção existente no órgão de Haller.

Em sua magnífica monografia de 1941 o órgão palpal de *Eulaelaps vitzthumi*, já descrito em 1935, passou despercebido a Schulze, ao fazer o estudo comparado do órgão de Haller nos *Ixodides* e ao estabelecer sua homologia com o órgão de Blumenthal de *Aranea*. Dessa inadvertência decorre a afirmativa de Schulze de não existirem órgãos capsulados semelhantes ao órgão de Haller em outros *Acari*, olvidado também que os *Notostigmata* têm órgão de Haller.

Labro relativamente fino, piloso até o ápice. Paralabros mais curtos e pilosos. Lascinae glabras e com fenda sub-apical. *Stylli* robustos e aparentemente canaliculados. Mandíbulas com trocanter e femur muito alargados, atingindo 170 micra de largura, com *pulvilli* de cerdas curtas e menores na base do dedo móvel e cerda simples na base do dedo fixo. Cada um dos dedos, que mede cêrca de 150 micra, apresenta dois dentes, excluidos os do ápice, tendo o *digitus fixus* um *pilus dentilis* curto e não dilatado. Epistoma do tipo *Haemogamasidae*, com cinco hastes de cada lado.

Descrição do macho

Êste é o primeiro encontro de um macho em espécie neotropica, tendo a fêmea sido descrita de material do Perú. O reconhecimento do gênero se faz também aqui à primeira vista graças à presença do órgão palpal semelhante ao da fêmea, com cinco ou seis câmaras. A formação basal desse órgão, que nas fêmeas se assemelha a um espinho de constituição muito fraca, é aqui bem quitinisada e forte. Algumas particularidades notadas no macho são relativas ao comprimento igual das cerdas das maxilicoxas, à implantação das cerdas esternais anteriores que parecem estar na preesternal. A placa holoventral é indivisa, bem alargada atrás das coxas do 4.º par e apresenta, atrás das cerdas genitais, cêrca de mais 50 pares de cerdas suplementares. No desenho a cerda anal impar é representada dupla (Fig. 7), o que certamente deriva de anomalia do exemplar, pois o outro macho tem cerda única na mesma situação.

Em um dos exemplares o idiossoma mede 966 micra de comprimento por 630 de largura máxima. A placa holoventral tem 700 micra na linha média, sendo de 420 micra a sua maior largura atrás do 4.º par. As cerdas esternais medem cêrca de 75 micra, sendo portanto subiguais. As cerdas suplementares têm entre 40 e 55 micra e as genitais 60 micra. Os estigmas ficam no intervalo entre as coxas III e IV e as peritrematalia se projetam para trás, sendo visíveis até a coxa II, ao passo que os peritremas podem ser acompanhados até o bordo da coxa I. O escudo dorsal (Fig. 10) mede cêrca de 920 micra e as cerdas 35 a 65 micra. Das cerdas do gnatossoma as médias internas medem cêrca de 85 micra e as médias externas 55 micra. O comprimento total do órgão palpal é de 40 micra. Mandíbulas muito robustas, medindo o gennal 80 micra de largura. O dedo fixo termina em dois dentes agudos e robustíssimos, entre os quais parece estar o porta-espermatoforo.

Nas patas não há espinhos nem mesmo nas coxas ou nos tarsos.

A espécie aqui redescrita foi encontrada três vêzes. Um lote continha, ao lado de *Bdellonyssus vitzthumi* (Fonseca 1941), também um *Ischnolaelaps* e um *Mesostigmata* não parasita. As fêmeas, em número de duas, receberam o N.º 3514, tendo sido capturadas a 28.IV.55 em Padilla, Bolívia, em ninho de rato silvestre, provàvelmente *Oryzomys* sp.. O material do outro lote tem o N.º 34 80, tendo sido capturado a 15.XII.54 em Vallecabajo, a 1500 metros de altitude, sôbre *Oxymycterus doris*, ao lado de *Atricholaelaps* (*Ischnolaelaps*) sp., *Laelaptidae* sp. e de *Cavilaelaps bresslaui*. Os dois machos pertencem ao lote N.º 3533, capturado sôbre um *Oryzomys legatus* em Serrano, Bolívia, ao lado de *Ischnolaelaps* sp. e de *Schistolaelaps mazzai*, constando esse lote de dois machos e de cinco fêmeas.

Schistolaelaps n. nom.

Em Notas de Acarologia XLIV, Inquerito sôbre a Fauna Acarológica de parastias do Nordeste do Brasil, *in* Memórias do Instituto Butantan XXVIII: 99, 1957-1958, vindas à luz em 11 de maio de 1959, criamos para o *Laelaps mazzai* Fonseca 1939, um novo gênero para o qual, por inadvertência, propuzemos o nome de *Schizolaelaps*, nome este pre-ocupado por *Schizolaelaps* Womersley 1956 *in* On some new Acarina Mesostigmata from Australia, New Zeeland and New Guinea — Linnean Society's Journal Zoology XLII (288): 505, 1956.

Portanto *Schizolaelaps* Womersley 1956 tem prioridade sôbre *Schizolaelaps* Fonseca 1959. Para este último propomos agora o novo nome *Schistolaelaps* n. nom.

Agradecemos a H. Womersley, do South Australian Museum, ter chamado a atenção para essa homonimia e aproveitamos a oportunidade para confirmar como genótipo o *Schizolaelaps bolbocerus* Womersley, pois êste autor propõe

dois genótipos para *Schizolaelaps*, *S. bolboceras* e *S. armstrongi* Womersley 1965, que não podem, evidentemente, coexistir como tais.

Schistolaelaps mazzai (Fonseca 1939)

Originalmente descrita no gênero *Laelaps*, de material argentino, remetida pelo grande incentivador de estudos de patologia regional que foi o pesquisador platino Dr. Salvador Mazza, esta pequena espécie mostrou em seguida ser frequente no nordeste brasileiro sôbre os ratos silvestres *Oryzomys eliurus*, *Proechimys albispinus*, *Hesperomys* sp., Rato Calunga, além de outros hospedeiros não identificados. Não deixa de ser interessante que *Schistolaelaps mazzai* não tenha sido jamais visto no Estado de São Paulo, que é região intermediária. Uma das suas características é a maior densidade de cerdas do escudo dorsal na região do podossoma da fêmea e, no macho, só descrito em 1959, a grande densidade de cerdas em todo o escudo dorsal e a placa anal separada da esterno-gênito-ventral. Desta espécie há os seguintes lotes bolivianos:

N.^{os} 3453 e 3460 de *Graomys griseoflavus* em Buen Retiro.

N.º 3503 de *Hesperomys muriculus* de Villa Montez.

N.^{os} 3506, 3510 e 3529, respectivamente de *Hesperomys muriculus* e de ninho de rato silvestre de Cabezas.

N.º 3513 de *Oryzomys* sp. (próximo de *flavescens*) de Gutierrez.

N.º 3533 de *Oryzomys legato*, de Serrano.

Os *Laelaptidae* com placas gênito-ventral e anal fundidas na fêmea, especialmente os do gênero *Tur* Baker et Wharton 1952, sin. *Protonyssus* Turk 1946, *nec Protonyssus* Trouessart 1915.

Entre os *Laelaptidae* parasitas mais curiosos da fauna neotrópica figura uma espécie da qual a princípio nos chegaram às mãos apenas dois exemplares fêmeas, vindos do Oriente boliviano. Por coincidência, aliás muito útil, recebemos logo a seguir material da mesma espécie, porém proveniente do Pará, e, logo depois, um exemplar do genótipo capturado na República do Panamá.

A espécie referida tem fêmeas de grandes dimensões, pouco menores do que as de um *Gigantolaelaps*, e sua quetotaxia lembra de perto um *Laelaps*, *sensu strictu*, logo se distinguindo deste gênero pelo seu androformismo, pois apresenta fundidas as placas gênito-ventral e anal. É, portanto, o aspecto inverso do observado em certos *Laelaptidae* machos androginos, como *Laelaps pachypus* Koch 1839, colocado por Zachvatkin no gênero *Hyperlaelaps* Zachvatkin 1948, ao lado de *Hyperlaelaps amphibius* Zachvatkin 1948, e como *Laelaps mazzai* Fonseca 1939, agora no gênero *Schistolaelaps* (Fonseca 1958), nos quais a placa anal é separada da esterno-gênito-ventral. Uma tal fusão de

placas na fêmea faz logo lembrar o gênero monotípico *Ugandolaelaps* Radford 1942, de cuja única espécie, *Ugandolaelaps protoxera* Radford 1942, também só são conhecidas fêmeas, aliás muito resumidamente descritas. Ao passo que a espécie africana de Uganda é muito pequena, apenas alcançando o idiossoma 600 micra, a espécie boliviano-brasileira tem comprimento mais de duas vêzes superior, atingindo o tamanho dos menores *Gigantolaelaps* e *Mysolaelaps*. A nova espécie difere da de Radford pelas cerdas muito robustas que apresenta no idiossoma, bem como nas maxilicoxas. A forma das placas ventrais é também inteiramente diversa. No novo *Tur* a esternal é muito curta e de bordo posterior muito arqueado; a região ventral tem a porção posterior gradativamente estreitada, não sendo arredondada como em *Ugandolaelaps*, fazendo com que a placa anal não seja tão alargada na espécie neotrópica. O número de cerdas das placas ventrais é também diferente, sendo na nova espécie idêntico ao dos *Laelaps*, ao passo que na espécie africana há dois pares esternais e só um na região gênito-ventral.

Andreacarus Radford 1953 é outro gênero em que os seus dois representantes ostentam fusão das suas mesmas placas. *Andreacarus petersi* Radford 1953 e *Andreacarus zumpti* Taufflieb 1956 foram capturados sôbre o Dermaptero *Hemimerus talpoides*, parasita de rato *Cricetomus gambianus* em Sierra Leone, na África, tendo o último ácaro sido também capturado sôbre os pelos do mesmo rato. No gênero *Andreacarus* as espécies conhecidas medem apenas 470 micra e 490 micra respectivamente, e a mandíbula das fêmeas tem um *digitus fixus* rudimentar, muito fino, sem dentes ou *pilus dentilis*, tornando problemática a sua permanência entre os *Laelaptidae*.

Embora o caráter de fusão das placas gênito-ventral e anal as aproxime, a fisionomia dessas espécies é de tal modo diversa que a sua colocação num mesmo gênero não parece justificável. O fato de ser o caráter em questão de importância superior ao das diferenças de robustez ou de número de cerdas das placas não convence a reuni-las num mesmo grupamento, o que poderia ser considerado procedimento artificial. Será preferível interpretar essa coincidência como devida a um caráter polifilético, resultando em convergência de aspecto sem a expressão de uma identidade filogenética.

A conformação das placas ventrais e o desenvolvimento quetotaxico tornam a nova espécie impressionantemente semelhante ao genótipo de *Protonyssus* Turk 1946, *nec Protonyssus* Trouessart 1915, o qual devido a essa homonimia recebeu o novo nome *Tur* Baker et Wharton 1952. Esse genótipo é o *Tur uniscutatus* (Turk 1946), do qual só era conhecido, até bem pouco tempo, o holótipo fêmea, capturado sôbre um *Proechimys calidius calidius* em Bulum, norte da República do Equador, a 21.XI.1900, a cêrca de 3.000 quilômetros em linha reta, da localidade onde foi capturada a espécie aqui estudada. Ao descrever o novo gênero, Turk o incluiu entre os da família *Macronyssidae*,

apesar de apresentar *pilus dentilis*. A falta de dentes e de *pulvillum* mandibulares, bem como a ausência de pelo próximo da base do *digitus fixus*, o afastariam dos *Laelaptidae*, família a que pertence decididamente a nova espécie, na qual apenas não poude ser vista a cerda próxima da base do *digitus fixus*. A circunstância de ser o genótipo de *Tur* conhecido apenas pelo holótipo fêmea montado em bálsamo do Canadá, fazia supor, já *a priori*, não ter sido possível ver aquelas formações mandibulares com maior nitidez devido à impropriedade do índice de refração do líquido de montagem. Por curiosa coincidência recebemos, para exâme, do Prof. A. Furman, da Universidade da California, um exemplar de *Tur uniscutatus* capturado no Panamá sôbre um *Proechimys cayennensis panamensis*, cuja estrutura mandibular poude agora ser observada com maior clareza, mostrando um nítido *pulvillum* e dentes mal desenvolvidos. Que não há pois razão para que *Tur* permaneça entre os *Macronyssidae*, passando em conseqüência para a família *Laelaptidae*, já o afirmaram Furman e Tipton em trabalho recente em que redescrevem a espécie.

De grande importância para a compreensão do gênero é a observação de Furman e Tipton em material de *Tur uniscutatus* da Venezuela, no qual, ao lado dos exemplares com placas gênito-ventral e anal fundidas, aparecem também outros espécimens em que tais placas são separadas. Em conseqüência disso o caráter de fusão dessas placas passa a ter importância secundária, predominando outros. Resultou desse critério a inclusão por Furman e Tipton no mesmo gênero *Tur* da espécie *Laelaps aragaoi* Fonseca (= *L. aragoensis* Fonseca). Aceitando o ponto de vista dos pesquisadores norte-americanos, descreve Fonseca em 1959 a espécie *Tur turki* encontrada no nordeste brasileiro também sôbre ratos dos gêneros *Proechimys* e *Rhipidomys*. Com a descrição das atuais espécies fica elevado a cinco o número dos constituintes do gênero *Tur* Baker et Wharton: *Tur uniscutatus* (Turk), *Tur aragaoi* (Fonseca), *Tur turki* Fonseca, *Tur aymara* sp.n. e *Tur amazonicus* sp.n. Dessas, a primeira pode ter ou não ter as placas ventrais do histerossoma fundidas na fêmea; na última não se conhece exemplar com tais placas separadas, ao passo que nas três outras não há exemplo de uma tal fusão.

Apresentamos a seguir chave utilisável para a distinção das espécies de *Tur*.

1. — Espinhos posteriores das maxilicoxas, anteriores e posteriores da coxa I e posteriores das coxas II e III curtos e fortes; trocanter II com espinho curto; placa anal separada, embora contígua à genito-ventral 2
— Não assim 3
2. — Cerdas da genito-ventral em linha; trocanter I e basifemur II com espinho ventral .... *T. aymara*.
— Das cerdas da genito-ventral só as três anteriores em linha trocanter I e basifemur II sem espinhos fortes ventrais ...... *T. aragaoi*.

3. — Espécie grande, com mais de 1000 micra; com menos de 39 pares de cerdas no escudo dorsal .... *T. amazonicus.*

— Espécies com menos de 1000 micra; com 39 pares de cerdas no escudo dorsal 4

4. — Placa anal com cerdas fortes e rombas; genito-ventral e anal separadas .... *T. turki.*

— Placa anal com cerdas delicadas e finas; genito-ventral e anal fundidas ou não .... *T. uniscutatus*

Tur amazonicus sp.n.

Figs. 9 e 10

Espécie grande, bem quitinisada, cuja quetotaxia lembra de perto a dos representantes do gênero *Laelaps* Koch. Só a fêmea é conhecida.

Idiossoma. — Elítico alongado, de extremidade anterior bruscamente afilada, de ombros bem pronunciados, com quitinização dorsal muito forte na região do metapodossoma e proximidades, onde tem coloração avermelhada. O comprimento do idiossoma é de 1330 micra e a maior largura é de 952 micra ao nível do metapodossoma.

Face ventral. — Tritoesterno dividido desde a base e densamente filamentoso em tôda extensão. Placa esternal de bordo anterior levemente convexo, tocando o gnatossoma e as coxas anteriores e bordo posterior muito fortemente arqueado, medindo 126 micra de comprimento na linha mediana por 196 micra de menor largura e 378 micra de intervalo entre as cerdas posteriores. Chama a atenção a robustez das cerdas, das quais as anteriores, separadas por intervalo de 100 micra, medem 168 micra; as médias têm 196 e as posteriores 140 micra. Placas metaesternais com cerda de 160 micra. Placa gênito-ventro-anal muito característica, semelhante à região correspondente da placa holoventral de *Laelaptidae* machos, com maior largura de 560 micra e de superfície percorrida por cêrca de 30 linhas transversais, apresentando quatro cerdas situadas em um mesmo alinhamento, das quais a genital, mais fraca, com 182 micra; as seguintes medem 210 micra, ficando as duas posteriores bem afastadas do bordo da placa. Região anal com cerdas anais muito robustas, as pares ao nível do meio do anus e com 112 micra e a impar com 160 micra. O anus tende para a forma circular, medindo 56 x 46 micra. Placas inguinais muito alargadas, com cêrca de 108 micra por 26 micra. Região ventral descoberta com 12 cerdas fortes, incluidas as dos bordos, a maior com 168 micra e a menor com 112 micra, medindo o par posterior, que é o menos robusto, 280 micra.

Face dorsal. — Escudo dorsal com 1260 micra de comprimento por 91
micra de maior largura, com área transversal mais escura que apresenta pro-
longamento mediano anterior e dois prolongamentos oblíquos posteriores.
Zonas areolares são mais frequentes ao nível do podossoma. As cerdas são

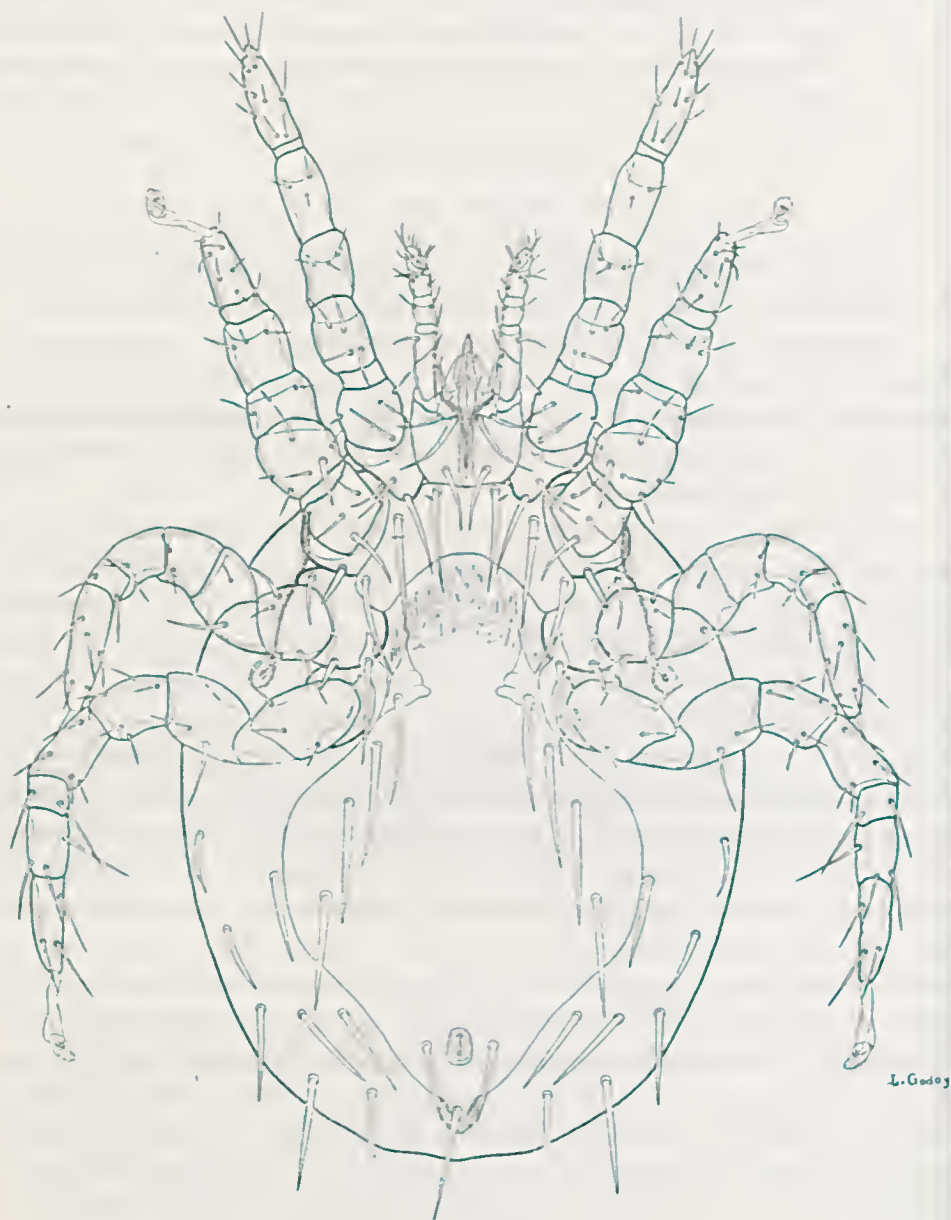



Fig. 9 — *Tur amazonicus* sp. n.

longas e robustas, mas não demasiado rígidas. Cerdas verticais anteriores e médias (F1 e F2 ou i1 e i2) pequenas e posterior longa (F3 ou i3). Há apenas

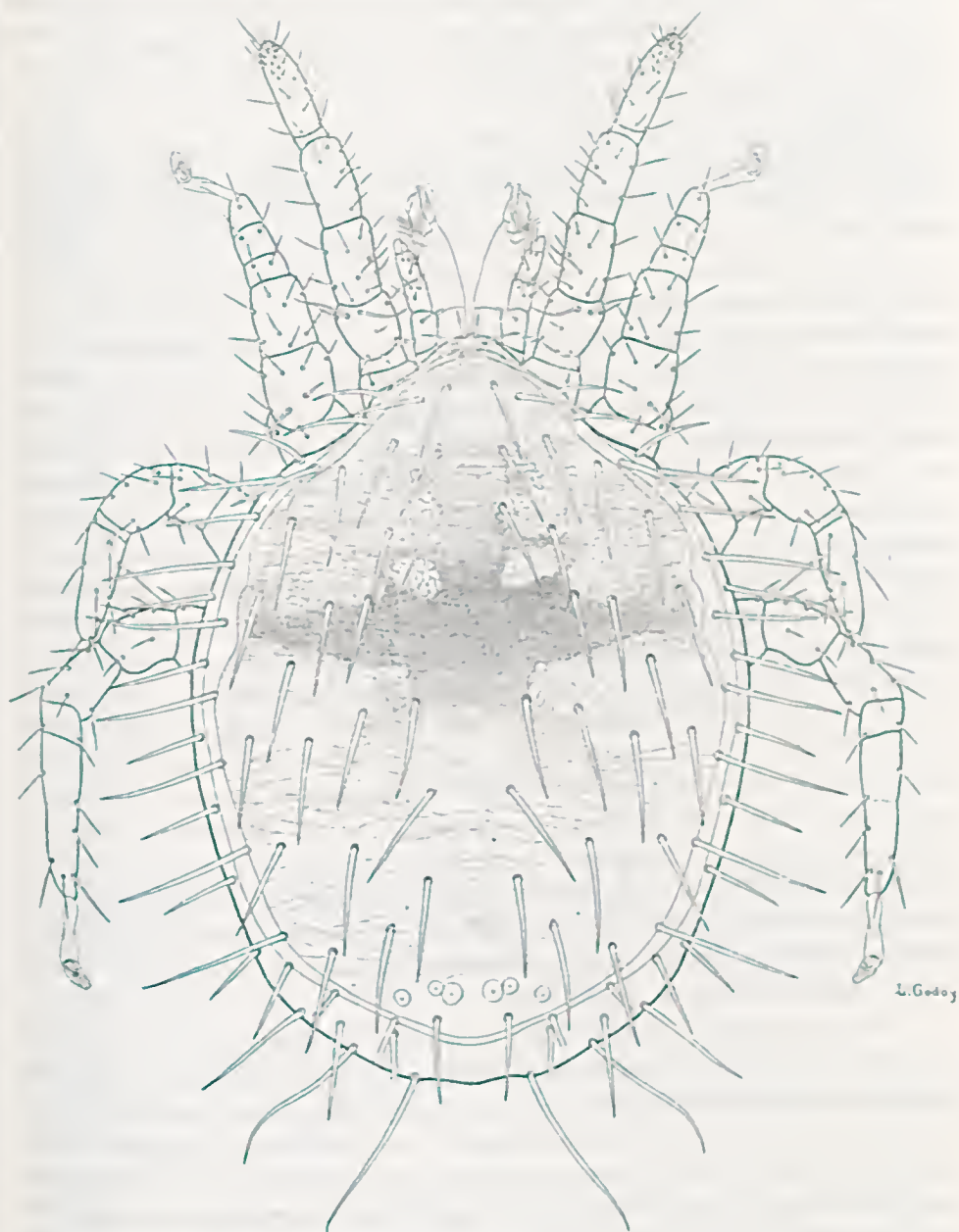



Fig. 10 — *Tur amazonicus* sp. n.

sete pares de cerdas submedianas, incluindo o par posterior marginal, parecendo faltar o pequeno par de cerdas que existe tão frequentemente em *Laelaps* spp. (S8 ou 15), que apresentam, além disso, maior número de pares de cerdas submedianas (D ou i). As maiores cerdas do escudo medem 180 micra e as menores 130 micra, excluindo as verticais (F ou i), tendo as posteriores marginais 154 micra. Nos bordos laterais do escudo há cerdas (M ou R) fortes, eretas, a maior das quais com 224 micra.

Gnatossoma. — O gnatossoma desta espécie apresenta um certo número de particularidades, entre as quais chama logo a atenção o grande desenvolvimento das cerdas maxilicoxais, das quais sòmente as anteriores são finas. As do par posterior medem 97 micra, as médias internas 122 micra e as externas 61 micra, ao passo que as anteriores têm 54 micra, sendo porém, delicadas. Tais medidas foram tomadas de um paratipo, pois no holótipo apenas está conservada uma das posteriores e as anteriores. A *rima hypopharyngis*, apresentando pelo menos cinco séries de dentículos, dos quais a anterior tem 8 elementos, não poude ser examinada minuciosamente por estar recoberta pelos ramos do tritocsterno, que nesta espécie são anormalmente pilosos. *Corniculi* finos, longos e de quitinização média. Soalho da hipofaringe com projeção membranosa média finamente denticulada. Labro curto pontudo, finamente piloso. Genual e femur da mandíbula robusto, êste com pulvillum de cêrca de 10 pêlos rígidos, ora curtos, ora longos, inseridos todos no mesmo ponto em uma curta haste, junto da base de *digitus mobilis*, não tendo sido vista a cerda única habitualmente existente em *Laelaptidae* na base do *digitus fixus*, a qual aparece modificada para formação membranosa curta. Este último *digitus* tem *pilus dentilis* forte e curto, não dilatado e dois dentes fortes, parecendo inerme o *digitus mobilis*. Há ainda uma formação membranosa que faz saliência entre os dois *digiti*, na região apical, onde é encurvada, lembrando igual aspecto visto em *Laelaps lateventralis* Fonseca. Epistoma largo, sem saliência, de bordos arredondados e entalhe mediano. Nada há que chame a atenção na morfologia dos palpos. Em um exemplar de *Protonyssus uniscutatus* Turk, remetido para exame por Furman, a cerda do *digitus fixus* é forte e longa, havendo vestígios apenas de dentes no *digitus mobilis*, sendo muito longas algumas cerdas do *pulvillum*.

Patas. — Embora a pata I seja a mais fina, não há alargamento das patas II e III. As cerdas das patas são finas, principalmente na pata I, e rígidas, havendo uma cerda mais longa dorsal no femur e no genual das patas I e II. Coxa I com duas cerdas robustas, longas e de ponta fina, aproximadas, em posição mediana. Coxa II com cerda posterior transformada em espinho longo e estreito. Coxa III com espinho posterior bem menor do que o da coxa II e cerda anterior. Coxa IV com cerda única muito delicada. Os tarsos terminam em duas garras, um pouco mais fortes na pata I.

Descrição do holótipo fêmea N.º 3464, capturado pelo Dr. J. M. de la Barrera a 3.XI.1964 em Buen Retiro, um pouco ao Norte e a Oeste de Santa Cruz de la Sierra, Bolívia, sôbre *Oligoryzomys* sp. Paratipo fêmea N.º 3462, da mesma localidade e capturado sôbre *Graomys griseoflavus*.

Para desenho foi utilizado o paratipo 3462.

Ainda se achava em estudo este material boliviano quando recebemos, em janeiro de 1956, por intermédio do Prof. Henrique Aragão, recentemente falecido, uma fêmea da mesma espécie, capturada a 23.XII.1955 sôbre "Rato d'água" (*Nectomys squamipes?*) em Mata da Utinga, Belém, Estado do Pará, Brasil, a êle remetido pelo Dr. Hugo Laemmert, a qual foi incluida em nossa coleção, onde figura com o N.º 3718.

O encontro desta espécie em localidades distantes cêrca de 2.000 quilômetros em linha reta e separadas por tão numerosos e caudalosos cursos d'água, talvez se explique por pertencerem ambas à Bacia Amazônica, embora situadas em dois extremos, e por ser possìvelmente efetuada a dispersão por intermédio de roedores de hábitos aquáticos, como sugere a denominação popular do hospedeiro do material brasileiro.

O nome específico escolhido para esta espécie, que poderia a primeira vista parecer inadequado, já que as capturas do material boliviano tiveram lugar em região próxima do Oriente da Bolívia, muito distante do rio Amazonas ou de Estado brasileiro do mesmo nome, fica, entretanto, justificado devido à circunstância já relatada, não se devendo, aliás, olvidar, que a bacia amazônica abrange área consideràvelmente maior do que as de quaisquer dos restantes grandes rios do globo.

Tur aymara sp.n.

Figs. 11 e 12

Em dois lotes recebidos da Bolívia, N.ºs 3452 e 3956, foi encontrada espécie pertencente ao grupo das que apresentam extensão e dilatação da gênito-ventral exageradas, estando as cerdas dessa placa num mesmo alinhamento e sendo algumas das cerdas das maxilicoxas muito robustas, para as quais foi recentemente proposto o gênero *Tur* Baker et Wharton.

Não há dúvida que se trata de espécie ainda desconhecida, sendo para ela proposto o nome de *Tur aymara* sp.n., recordação de antiga população andina da região boliviana.

Espécie bem quitinizada, elíptica alargada, de placas e tegumento descoberto com cerdas espiniformes fortes. O comprimento bem maior do espinho posterior das maxilicoxas na nova espécie logo a distingue de *Tur aragaoi* Fonseca, na qual este espinho é curto.

Idiossoma. — Com cêrca de 770 micra de comprimento e maior largura de 630 micra atrás do quarto par de patas, de ombros muito pronunciados e extremidade anterior estreitada.

Face ventral. — O tritoesterno é piloso na metade distal dos ramos bifurcados. A placa esternal é trapezoidal, medindo de comprimento 115 micra na linha mediana; no bordo anterior tem cêrca de 198 micra de largura, incluídos os prolongamentos, sendo a maior largura, atrás, de 204 micra e a menor largura 180 micra. A superfície é reticulada. Bordo anterior ligeiramente avançado na altura das cerdas e posterior côncavo. As cerdas são tôdas de base muito alargada, robusta, e ponta muito afilada; as do par

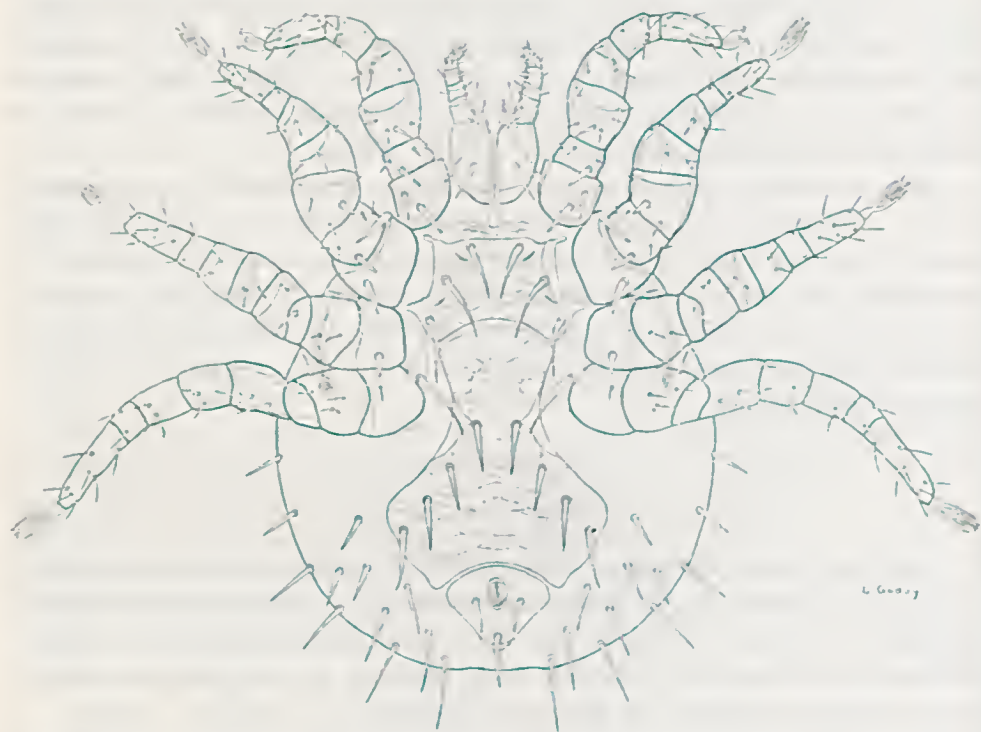



Fig. 11 — *Tur aymara* sp. n.

anterior ficam perto do bordo anterior e afastadas dos bordos laterais, muito aproximadas, portanto, deixando intervalo de 54 micra e medindo 86 micra de comprimento; as do segundo par ficam próximas dos bordos laterais e têm

pràticamente o mesmo comprimento, sendo porém, mais robustas; as do terceiro par medem 108 micra e ficam implantadas a cêrca de 28 micra do bordo posterior. As cerdas metaesternais estão situadas numa elevação robusta que constitue a porção posterior das placas endopodais, são igualmente fortes e medem 100 micra. A placa gênito-ventral pràticamente toca a anal, sendo de cêrca de 3 micra apenas o intervalo, havendo no bordo posterior uma concavidade larga para acomodação da placa anal. As quatro cerdas estão dispostas em uma linha reta que termina atrás no ponto mais largo da placa, sendo a distância entre a 2.ª e a 3.ª cerdas um pouco maior do que entre a 1.ª e a 2.ª

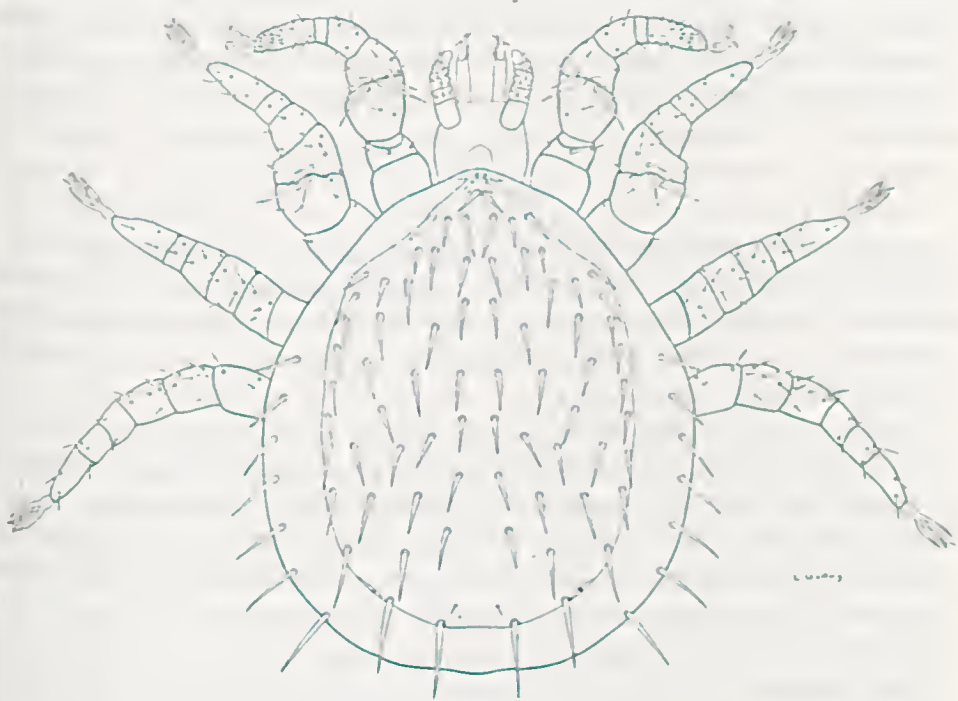



Fig. 12 — *Tur aymara* sp. n.

e entre a 3.ª e a 4.ª, ficando esta última muito afastada do bordo posterior do qual a separa um intervalo de cêrca de 90 micra. As cerdas desta placa, muito robustas, são subiguais medindo 82 a 100 micra e estão implantadas para dentro do bordo externo da placa. A placa anal é muito larga, tendo cêrca de 150 micra de largura por um comprimento de cêrca de 130 micra. O orifício anal dista 25 micra da margem anterior. As três cerdas são muito robustas,

de ponta romba, medindo as pares cêrca de 54 micra e a impar mais ou menos 85 micra, ficando aquelas em nível anterior ao polo posterior do anus. As placas inguinais são ovoides, pequenas, com cêrca de 40 micra de comprimento por 18 micra de maior largura, e de quitinização fraca. Superfície ventral descoberta com quatro ou seis cerdas espiniformes, muito fortes, internas, de cada lado. Estigmas na posição habitual e peritrema visível até a altura da coxa I, sinuoso, com peritrematalia bem quitinizada.

Face dorsal. — Escudo dorsal, deixando descoberta margem relativamente larga, é mais quitinizado à frente onde o polo anterior é ligeiramente projetado, apresentando ombros muito salientes. A quetotaxia do escudo dorsal obedece em disposição e número o mesmo esquema característico do gênero *Laelaps*. As cerdas verticais anteriores e o pequeno par submediano posterior (F1 e SS de Zachvatkin; il e il' e J5 e J5' de Hirschmann), ainda menor, são os únicos fracos; as restantes cerdas são fortes, rigidas e afiladas, aumentando o comprimento à medida que são mais posteriores, medindo o primeiro par submediano (V de Zachvatkin; s2 e s2' de Hirschmann) 70 micra e o posterior marginal (M11 de Zachvatkin; Z5 e Z5' de Hirschmann) 115 micra. O último par submediano (SS de Zachvatkin, J5 e J5' de Hirschmann) à frente do marginal posterior, contrastante, tendo apenas 11 micra, é o menor de todos. A superfície do escudo é levemente reticulada, não tendo sido vista escultura. A superfície dorsal descoberta tem meia duzia de cerdas rígidas e fortes, as posteriores maiores.

Patas. — São curtas e fortes, sendo maiores as do IV par. Coxa 1 com dois fortíssimos espinhos, o proximal maior e de situação mediana e o distal de posição mais externa. Coxa II com dois espinhos tão fortes quanto os da coxa I, sendo o anterior o maior de todos. Coxa II com cerda anterior e espinho posterior menor do que os das outras coxas. Coxa IV com cerda minúscula. Trocanteres I e II e basifemur II com espinho ventral forte de tamanho mais ou menos igual ao do distal da coxa I.

Gnatossoma. — O gnatossoma é relativamente curto e estreito. As maxilicoxas apresentam um par de cerdas posteriores de robustez incomum, com dimensões quase iguais às do espinho proximal da coxa I, sendo também muito desenvolvidas as cerdas médias internas. Contrasta a pequenez e delicadeza das cerdas externas e da cerda anterior da mesma região. Na *rima hypopharyngis* não foram vistos dentículos. Palpos delicados, com cerdas fracas. Mandíbulas com *pulvillum* de cerdas longas na base do *digitus mobilis* e *pilus dentilis* curto no *digitus fixus*. Outros detalhes não são perceptíveis.

Descrição do holótipo fêmea n.º 3452, capturado sôbre *Graomys griseoflavus* em Buen Retiro a 26.X.1954. Na mesma localidade foram capturados

os paratipos N.º 3463, também fêmeas, sôbre *Oligoryzomys* sp., também parasitado por *Tur amazonicus* sp.n.

Macronyssidae

É esta a primeira vez que são assinalados ácaros dessa família em território boliviano. Duas foram as espécies encontradas, ambas do gênero *Bdellonyssus* Fonseca 1941, das quais uma relativamente freqüente e a outra rara.

Gênero *Bdellonyssus* Fonseca 1941

O gênero *Bdellonyssus*, erigido em 1941 e com a espécie tipo *Liponyssus bacoti* (Hirst 1913), foi posto em sinonimia de *Ornithonyssus* Sambon 1928, com a espécie tipo *Leiognatus sylviarum* (Can. et Fanzago 1877). As diferenças existentes entre as duas espécies tipo, entretanto, permitem, segundo opinião que expendi em 1959, reconhecer a validade dos dois gêneros, dos quais o primeiro com o seu amplo valor original e o segundo restrito à espécie tipo.

Bdellonyssus viscaccia Fonseca 1960

Figs. 13 e 14

A espécie, rara, apresenta características tais que a tornam fàcilmente reconhecível entre tôdas as restantes. As cerdas do escudo dorsal são muito curtas, como também as terminais posteriores; o espinho do palpo da fêmea é muito longo; a placa anal é alongada e a placa esternal é de estrutura diferenciada em tôda a zona que fica à frente do par de póros anteriores. Sòmente este último caráter seria suficiente para distinguir a espécie das congêneres, pois diferenciação da placa em espécie do gênero *Bdellonyssus* sòmente ocorre raramente e na sua margem posterior. Apresentaremos redescrição desta espécie aproveitando o material boliviano, já que a descrição vinda à luz no tomo II, fascículo I de "*Acarologia*" foi feita do material peruano.

As alterações observadas na placa esternal dos *Macronyssidae*, com exceção dos órgãos sensoriais encontrados nos gêneros *Lepronyssoides* Fonseca e *Hirstesia* Fonseca, têm sempre localização posterior, redundando na posição exterior do terceiro par de cerdas esternais, como acontece nos gêneros *Ornithonyssus* Sambon, *Ophionyssus* Mégnin, *Sauronyssus* Sambon e *Neoichoronyssus* Fonseca, ora, no espessamento do bordo posterior, como se verifica em *Ichoronyssus haematophagus* (Fonseca 1935) ou em *Steatonysus joaquimi* (Fonseca 1935).

Constituiu, portanto, surprêsa o encontro de uma espécie, coletada no Perú e na Bolívia, em que a região anterior da eternal é desquitinisada em tôda largura, a partir do nível dos póros anteriores até o bordo, aspecto êste que não tem paralelo entre os membros da família. Coincidindo os caracteres

genéricos, quer do macho, quer da fêmea, com os dois gênero *Bdellonyssus* Fonseca 1941, ela aí fica colocada como membro fàcilmente diagnosticável, provàvelmente caracterizando a fauna andina.

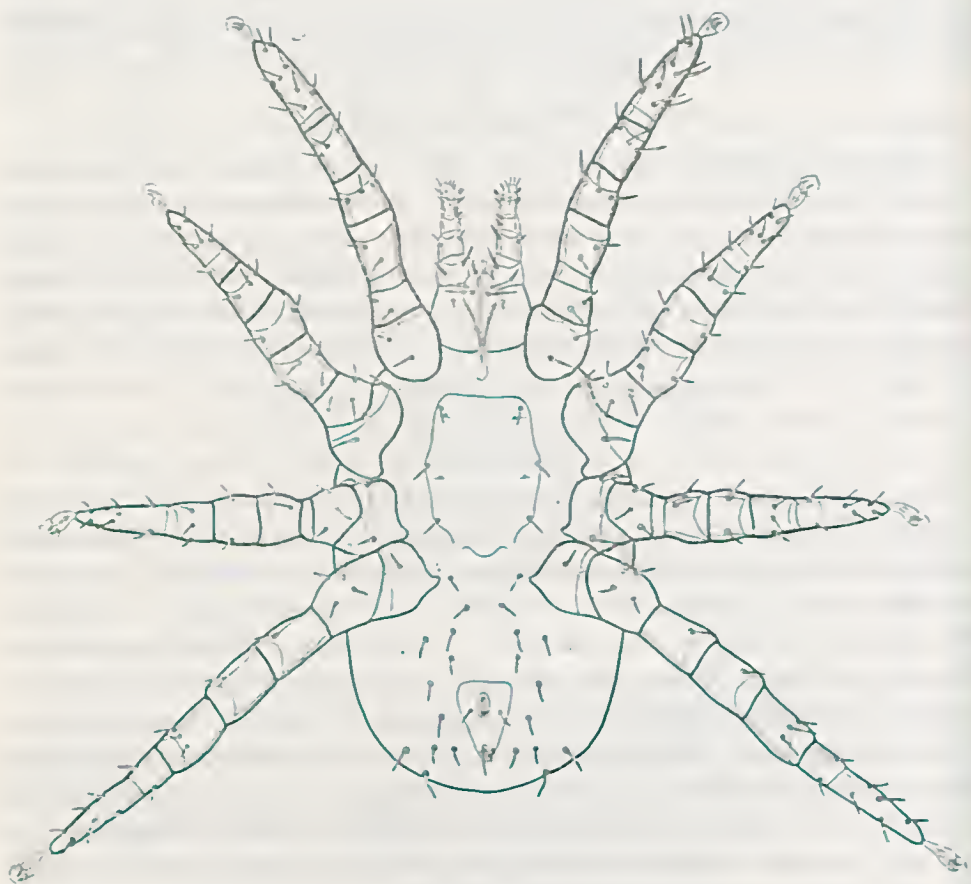



Fig. 13 — *Bdellonyssus viscaccia* Fonseca 1960

Redescrição da fêmea

Chama a atenção desde logo o fato de ser espécie mais estreita do que é habitual, parecendo também não ser capaz de grande distensão quando alimentada. A coloração é pálida e a quitinisação fraca. Os caracteres gerais são de *Macronyssidae* típico.

Idiossoma. — Mede 840 a 870 micra de comprimento por uma largura máxima de 380 micra em exemplar não distendido, ao nível do propodossoma ou 540 micra no exemplar alargado, ao nível do histerossoma, parecendo o

maior alargamento ser causado não pelo hematofagismo, como é frequente no gênero, mas pela gravidez, pois os coeca são visíveis e a quantidade de resíduo que contêm é insuficiente para provocar grande distensão.

Face ventral. — A esternal, precedida de preesternal nítida, é absolutamente típica devido à desquitinisação que sofre o têrço anterior, a partir do nível dos póros anteriores, raramente ficando assinalado o bordo anterior cujo

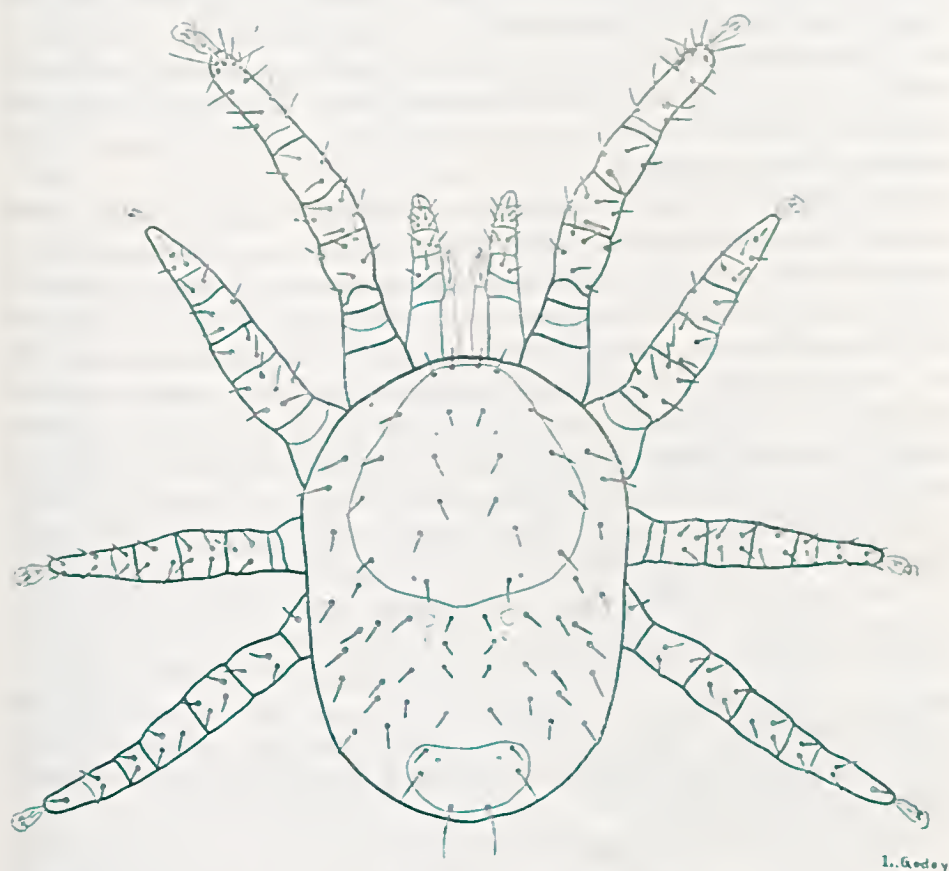



Fig. 14— *Bdellonyssus viscaccia* Fonseca 1960

limite só é de regra reconhecível devido ao aspecto de pontilhado irregular que apresenta a área desquitinisada. 64 micra de comprimento na linha média, inclusive a área desquitinisada, e 32 micra sem esta, por menor largura de 115 micra foram as medidas obtidas num cótipo mais claro, sendo aproximadamente as mesmas nos restantes. O bordo posterior da placa é bastante

arqueado. As cerdas são pràticamente iguais, com 40 micra nos três pares. Já as cerdas metaesternais são maiores, medindo cêrca de 50 micra. O tritoesterno, de visibilidade difícil, é pouco filamentoso. A placa genital é afilada, mas de ponta romba, medindo as cerdas 50 micra. Placas inguinais alongadas, pouco quitinisadas. Anal alongada, com 170 micra de comprimento por 75 micra de maior largura, com anus a 13 micra do bordo anterior e 44 micra de comprimento. Cerdas anais pares pouco à frente do polo posterior do anus, com 25 micra e cerda impar com 36 micra. Superfície descoberta do histerossoma percorrida de sulcos que lembram impressões digitais, com cêrca de 30 cerdas de cada lado, tôdas lisas e finas, as medianas menores e as posteriores um pouco maiores, variando entre 35 e 45 micra. Existe um par de poros brilhantes, um de cada lado, bem distanciados da placa genital, não tendo sido vistas plaquetas paragenitais.

Face dorsal. — Com um escudo que a recobre inteiramente até o nível da coxa II, estreitado em seguida aos poucos e mais bruscamente ao nível do 1/5 posterior, terminando em extremidade romba ao nível do intervalo entre o cribrum e o anus. Seu comprimento é de 730 micra. A maior largura é de 350 micra ao nível das coxas III, medindo, ao nível do bordo posterior da coxa IV, 280 micra e ao nível do limite com a região mais bruscamente estreitada 168 micra; na altura do 2.° par de cerdas do grupo de 3 pares posteriores mede 55 micra de largura. A superfície é reticulada, tem áreas de "escultura" mais clara e é provida de pêlos curtos, com o número e disposição habituais no gênero *Bdellonyssus*. As cerdas verticais estão dispostas em dois pares, o posterior (F3 de Zachvatkin) sendo, com o par anterior do escudo que lhe fica para trás (V de Zachvatkin), o mais longo, medindo cêrca de 40 micra. O menor par de cerdas é o anterior (D 7 segundo Bregetova) do grupo posterior de marginais, que deve orçar por volta de 15 micra, difícil de medir devido à posição semiereta. A pequeníssima cerda (SS de Bregetova) que costuma existir entre o par mais anterior (D 7) dêsse grupo de três e o médio (D 8), não aparece nesta espécie. Na superfície descoberta há cêrca de trinta cerdas lisas de cada lado.

Gnatossoma. — Maxilicoxas com cerdas anteriores muito menores do que as dos outros pares, sendo longas as médias internas. *Rima hypopharyngis* com cêrca de 9 dentículos dispostos em linha longitudinal. A característica principal do gnatossoma está no espinho interno do ápice do primeiro artículo dos palpos, bem mais afilado e mais longo do que o habitual no gênero, tendo cêrca de 22 micra por uma largura de 5 micra na base. Outras peças não puderam ser examinadas devido à retração das mandíbulas em todos os cótipos.

Patas. — Pata I e IV com artículos longos e II e III com esses segmentos encurtados. Coxas com os pêlos habituais em situação normal para o gênero,

sendo mais forte o anterior da coxa III e mais fraco e menor o da coxa IV. O espinho dorsal da coxa II é difícil de destacar, apenas podendo ser visto por transparência devido à aproximação das coxas I e II. Tôdas as patas têm *pulvilli* e duas garras pedunculadas.

Redescrição do macho

O macho difere das fêmeas pelas dimensões menores, holoventral integra, nenhuma desquitinisação na região anterior e ausência do espinho do palpo.

Idiossoma. — Face ventral. — Tritoesterno pouco visível, não sendo percebidos filamentos. Placa holoventral integra, como é característico no gênero *Bdellonyssus*, um tanto dilatada no início da região ventral e sofrendo ligeira constrição no ponto de fusão com a anal. Região esternal bem quitinisada, ao contrário da fêmea, fazendo o órgão masculino saliência forte no bordo anterior. Cerdas holoventais subiguais, havendo cêrca de 11 cerdas irregularmente dispostas entre o par genital e a região anal. Cerdas anais menores, as pares situadas entre o polo anterior e o meio do anus. A região descoberta apresenta cêrca de 12 cerdas de cada lado. A placa inguinal é alongada como a da fêmea e dificilmente perceptível. Os peritremas, localisados no bordo do idiossoma, não alcançam o meio da coxa II.

Face dorsal. — O escudo dorsal, de exame muito difícil no alótipo passa a estreitar-se ao nível do intervalo entre as coxas III e IV e termina em região que, embora mais estreitada, o é de modo menos acentuado do que a da fêmea. Só o par de cerdas verticais anteriores parece ser mais longo e robusto. Na extremidade posterior só foi visto o par de cerdas apical. (M 11 de Zachvatkin) de elementos pequenos. Na superfície há cerdas esparsas, pequenas.

Nos *cocca* do alótipo é vista a mesma quantidade de detritos observada nas fêmeas.

Gnatossoma. — Cerdas anteriores e posteriores das maxilicoxas subiguais e médias bem maiores, sendo a interna a mais longa. No lugar do esporão do 1.º artículo dos palpos da fêmea há uma cerda fraca. Mandíbulas modificadas, com um dos dedos muito forte e mais longo, não tendo sido possível o exame minucioso.

Patas. — As do 1.º par são mais longas, seguindo-se ao do 4.º par. Nas coxas as cerdas habituais, mais fortes na coxa III. Tarsos dos três pares posteriores com duas pequenas saliências ventrais, servindo à implantação de cerdas.

Redescrição de oito fêmeas e um macho montados em duas lâminas N.º 3523, capturados pelo Dr. J. M. de la Barrera a 28.II.55 sôbre *Lagidium viscaccia*, em Monos, Bolívia, a 1434 m de altitude.

Bdellonyssus vitzthumi Fonseca 1941

A espécie mais freqüente no material é de identificação difícil, pertencendo ao grupo formado pelas espécies *lutzi*, *vitzthumi*, *monteiroi* e *hirsti*, as três primeiras por mim descritas de ratos silvestres do Brasil e a última de Cavídeo da Argentina.

A espécie da Bolívia aproxima-se mais de *Bdellonyssus vitzthumi* Fonseca 1941, distinguindo-se desta por detalhes tão pouco significativos que não cremos dever erigir nova espécie sôbre base tão fraca. É, portanto, espécie com pequeno esporão no primeiro artículo dos palpos, de escudo dorsal afilado atrás, onde existem três pares de cerdas subiguais, sendo longas tôdas as cerdas do escudo dorsal. As placas ventrais são absolutamente normais. *Bdellonyssus vitzthumi* foi encontrado nos seguinte lotes:

N.os 3440, 3477, 3489, 3491, 3502, 3509, 3510 — *Galea musteloides* — de Aiguile, a 2225 metros de altitude e de Valleabajo, a 1500 metros; Samaipata, a 1650 metros; Valle Grande e Cuevo.

N.º 3467 — *Leptosciurus leucogaster* de Água Hedionda.

N.os 3485, 3487 e 3525 — *Graomys griscoflavus* em Samaipata e em Padilla.

N.os 3507 e 3520 — *Hesperomys muricolus* de Cabezas.

N.º 3517 — *Oryzomys* sp. de Padilla.

Trombidiformes

Trombiculidae

Sôbre um mesmo exemplar de *Lagidium viscaccia* foram encontrados dez exemplares de *Trombiculidae*, dos quais um caracterizado pelos segmentos encurtados das patas, pertencente a gênero que não poude ser identificado no único exemplar danificado existente, três incluíveis no gênero *Schoengastia*, subgênero *Euschoengastia* e seis pertencentes ao gênero *Tragardhula* Berlese 1912. Tais determinações genéricas foram feitas seguindo o critério adotado por Womersley na monumental revisão das *Trombiculidae* da região asiático-pacífica, de 1952, levada em consideração uma sua nota, apensa à pág. 170, sôbre a sinonimia de *Ascoschoengastia* Ewing 1945 com *Euschoengastia* Ewing 1938. Sôbre um exemplar de *Galea musteloides* foram achados dois exemplares de uma *Trombicula* (*Trombicula*). A comparação desse material da Bolívia com os *Trombiculidae* da Colômbia, descritos por Boshell e Kerr, e do Perú por Wharton, revelou diferenças que permitiram considerar novas tôdas as espécies.

Gênero *Schoengastia* Oudemans 1910

Schoengastia (Euschoengastia) audyi sp.n.

Figs. 15 a 17

Larvas engorgitadas com ligeira constrição do idiossoma pouco atrás do terceiro par de patas, que fica muito afastado dos dois anteriores. O escudo do propodossoma tem cinco cerdas além de dois órgãos pseudo-estigmáticos, estes clavados, com forma de raqueta um pouco alongada. A fórmula standard do escudo é a seguinte: AW — 44 micra AP — 22 micra PW — 63 micra SB — 27 micra ASB — 25 micra PSD — 24 micra AL — 24 micra PL — 42 micra e ML — 36 micra.

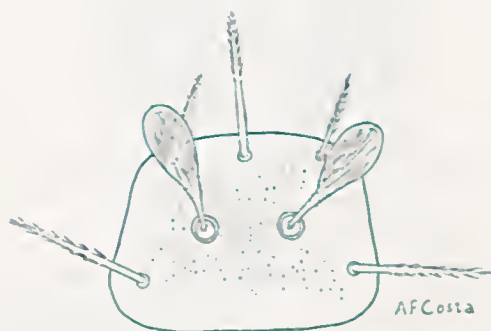



Fig. 15 — *Schoengastia (Euschoengastia) audyi* sp. n.

O escudo é retangular com bordos anterior e posterior ligeiramente côncavos e bordo lateral levemente deprimido entre o nível dos pseudostigmas e a cerda antero-mediana, mais nítidas entre os pseudoestigmas. As cerdas antero-laterais são as mais finas tendo, tôdas, cinco filamentos curtos. As hastes dos órgãos pseudo-estigmáticos medem cêrca de 12 micra e são espinhosas, da mesma forma que as clavas.

O idiossoma é mais piloso na superfície ventral do opistossoma, tendo as cerdas aproximadamente a seguinte fórmula que, obtida em exemplares engorgitados, é sempre difícil de determinar com exatidão:

Dorsais: 2, 6, 6, 6, 6, 4, 4. Ventrais: 2, 6, 4, 6, 6, 4, 4, 6, 6, 2.

O gnatossoma tem mandíbula simples, com pequeníssimos dentes dorsal e ventral.

A cerda galeal é pectinada, apresentando cêrca de três ramúsculus apenas. Garra do palpo trifurcada, com ramo axial maior e ventral menor. Cerdas coxal, femural e genual pectinadas, a última muito ligeiramente. Cerdas tibiais dorsal, ventral e lateral pectinadas.

Patas com sete segmentos. Tarso I com uma cerda apical e uma subapical lisa e um espinho, do tipo dos solenídeos de Grandjean, de localização mediana, além de cêrca de 20 cerdas pectinadas. Tíbia I com três cerdas lisas, das quais uma é um solenídio e uma é muito curta. Tarso III com 12 cerdas tôdas pectinadas e tíbia III com uma cerda lisa curta e 6 pectinadas. Tôdas as coxas com uma só cerda pectinada.

Descrição feita de um exemplar holótipo N.º 3437 capturado sôbre *Lagidium viscaccia* em Monos, Bolívia. Dois paratipos do mesmo lote N.º 5141.

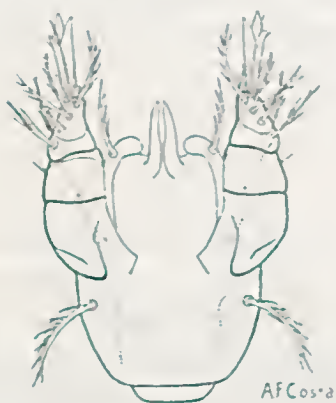



Fig. 16 — *Schoengastia (Euschoengastia) audyi* sp. n.

O nome específico é dado em homenagem a J. R. Audy pelo enorme acervo de conhecimentos com que vem enriquecendo o estudo dos *Trombiculidae* e pelo esfôrço que vem dispendendo para o conhecimento das regras gerais que condicionam o entretenimento dos focos de zoonoses em condições naturais.

Fig. 17 — *Schoengastia (Euschoengastia) audyi* sp. n.

Gênero *Tragardhula* Berlese 1912

Tragardhula traubi sp.n.

Figs. 18 a 20

Larvas repletas ligeiramente deprimidas logo atrás da coxa III, com cerdas normais, escudo do propodossoma pentagonal e provido de cinco cerdas e órgãos pseudoestigmáticos filamentosos, com olhos, de mandíbulas simples, garra do palpo trifurcada, patas com sete segmentos, sem cerdas flageliformes, coxa com uma única cerda, empódio normal.

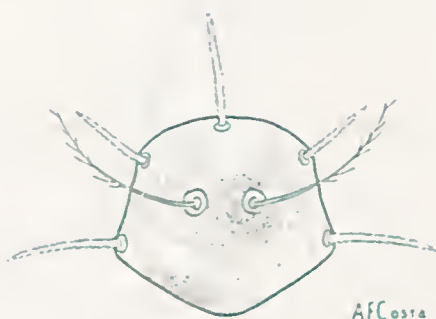



Fig. 18 — *Tragardhula traubi* sp. n.

As medidas standard do escudo são:
AW — 48 micra AP — 29 micra PW — 55 micra SB — 18 micra ASB — 22 micra PSB 32.5 micra ML — 30 micra AL 22 micra PL — 30 micra S — 52 micra.

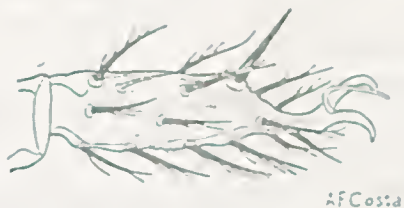



Fig. 19 — *Tragardhula traubi* sp. n.

Escudo pentagonal, portanto com bordo posterior anguloso, bordos anterior e laterais com leves depressões, com cerdas anterolaterais muito afastadas do bordo anterior e cerda mediana anterior no bordo. Órgãos pseudoestigmáticos filamentosos, sòmente pilosos além da metade basal. Pontuações regularmente distribuidas, sòmente rareando dos lados e atrás da cerda mediana anterior.

Cerdas dorsais com fórmula 6 : 6 : 2 : 6 : 6 : 4 : 4 : 2.

Ventrais: 2 : 2 : 6 : 6 : 6 : 4 : 4 : 2.

Gnatossoma com mandíbulas simples e cerda galeal núa: palpos com ga trifurcada e cerdas coxal. femural. genual e as três tibiais pectinadas, te a tibial lateral e a ventral apenas um ramúsculo cada uma.

Fig. 20 — *Tragardhula traubi* sp. n.

Patas com sete segmentos, sendo os tarsos relativamente curtos. Cox com uma só cerda pectinada. Tarso I com 1 solenídio e uma cerda apical curt lisa e 19 cerdas pectinadas. Tarso II com 1 cerda apical lisa e 16 cerdas pec nadas. Tarso III com 2 cerdas lisas e 11 cerdas pectinadas. Tíbia I com cerdas lisas, das quais uma é um solenídio e outra é muito curta e oito cerd pectinadas. Tíbia II com 1 solenídio, 1 cerda lisa e seis pectinadas. Tíbia I com 1 cerda lisa e seis pectinadas.

Descrição de cinco cótipos N.º 3471, montados em cinco lâminas, capt rados sôbre *Lagidium viscaccia*, em Monos, Bolívia.

A espécie é dedicada a R. Traub que tanto tem contribuido para o estu dos *Trombiculidae*.

Gênero *Trombicula* Berlese 1905

Trombicula (*Trombicula*) *whartoni* sp.n.

Fig. 21

Exemplar repleto de contôrno elítico, sem constrição; idiossoma com 4 micra de comprimento e inteiramente encurvado para a face ventral na altu do escudo, o que dificulta a tomada das medidas. Escudo dorsal muito m

largo do que longo, com pontuações muito nítidas mas ausentes ao redor da cerda antero-mediana, de bordo lateral reto e bordo posterior fortemente convexo, com cerdas de robustez igual e órgãos pseudoestigmáticos finos e pilosos só de um lado na metade distal, implantados a distância igual dos bordos anterior e posterior.

Escudo dorsal com as seguintes medidas:
AW — 68 micra AP — 23 micra PW — 79 micra SB — 36 micra ASB — 18 micra PSB — 18 micra AL 39 micra PL 50 micra S 54 micra AM — 32 micra.

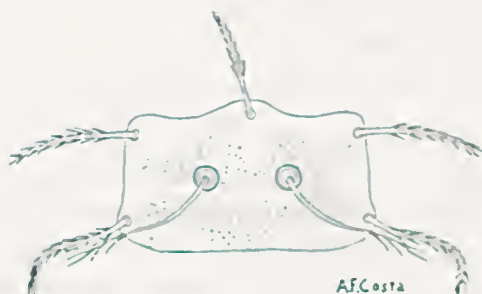



Fig. 21 — *Trombicula (Trombicula) whartoni* sp. n.

Na larva, muito distendida, podem-se reconhecer fileiras de poucas cerdas de posição muito oblíqua para trás, com a seguinte fórmula:

Dorsais: 2: 6: 6: 4: 2: 2 ou 2: 6: 6: 2: 4: 2.

Ventrais: 2: 2: 2: 4: 2: 2: ou 2: 2: 4: 2: 2: 2.

Gnatossoma com mandíbulas simples com a forma habitual no gênero. Cerda galeal nua.

Patas com sete segmentos. Tarso I com uma cerda apical nua, muito fina e um "espinho" do tipo solenídio de localização mediana, além de cêrca de 18 cerdas pectinadas. Tíbia I com duas cerdas lisas de comprimento médio e 6 pectinadas. Tarso III com duas cerdas lisas muito longas, flageliformes, e cêrca de dez cerdas pectinadas, tíbia IIII com duas cerdas lisas, uma bastante longa e outra relativamente curta, e quatro cerdas pectinadas. Tôdas as coxas com uma só cerda pectinada.

Descrição de dois cótipos N.º 3479, capturados sôbre *Galea musteloides*, em Valleabajo, Bolívia. Nome específico é dado em homenagem ao notável pesquizador e especialista em *Trombiculidae*, G. M. Wharton.

Trombiculinae sp.

Existe um único exemplar repleto desta espécie montado em situação que não permite o exame de todos os detalhes, não tendo sido possível fixar a posição genérica.

A fórma do escudo dorsal não é perceptível, mesmo com observação em microscópio de fase, parecendo não haver diferenciação entre êle e o tegumento, pois êste é crivado de pontuações, tanto na superfície dorsal quanto na ventral, apenas faltando nas proximidades dos órgãos pseudoestigmáticos. Estes são globosos e partem de uma formação caliciforme.

Á frente dêles se vêm as cerdas antero-laterais e a mediana, as duas primeiras aparentemente nuas e extremamente finas. As postero-laterais são bem maiores e mais robustas, aparentando o tipo pectinado comum. As medidas padrão do escudo não podem, portanto, ser apresentadas, sendo as seguintes as medidas das cerdas:

AL — 15 micra ML — 18 micra PL — 34 micra S — 21 micra.

As mandíbulas são extremamente curtas e curvadas, de ápice simples. Os palpos têm garra tricuspide, não encurtada como em *Ornoschoengastia*. A fórmula das cerdas dorsais e ventrais do idiossoma não poude ser definida. As patas têm sete segmentos, apresentando as coxas I e II uma só cerda e a coxa III oito cerdas. Os segmentos são notàvelmente encurtados nas patas I e II. O exemplar único acha-se montado na lâmina N.º 3854.

S U M A R Y

In a first acarological surwey in Bolivia some twenty two species have been found. The material was captured by Dr. J. M. de la Barrera mainly on rodents and send to the author by the Panamerican Sanitary Bureau.

Eubrachylaelaps rotundus Fonseca 1936, from *Oecomys mamorae*, at Buen Retiro and *Akodon mollis* at Novillos. *Laelaps castroi* Fonseca 1959 on *Graomys griscoflavus* and *Dasyprocta variegata*, both at Buen Retiro. *Schistolaelaps mazzai* (Fonseca 1939), on *Graomys griseoflavus* at Buen Retiro *Hesperomys muriculus* at Vila Montes and Cabezas; nest of wild rat at Cabezas; *Oryzomys* sp. at Gutierrez and *Oryzomys legatus* at Serrano. *Cavilaelaps bresslaui* Fonseca 1936, on *Akodon mollis* at Novillos, *Oxymycterus doris* at Valleabajo. *Galea musteloides* at Samaipata Valle Grande and Padilla; *Graomys griseoflavus* at Samaipata and Água Hedionda. *Gigantolaelaps goyanensis* Fonseca 1939 on *Hesperomys muriculus* at Buen Retiro. *Gigantolaelaps wolffsohni* Oudemans 1910 on *Graomys griseoflavus* at Floripondio and *Hesperomys muriculus* at Cabezas. *Mysolaelaps parvispinosus* Fonseca 1936 on *Oecomys mamorae* at Buen Retiro. *Mysolaelaps heteronychus* Fonseca 1959 on *Oxymycterus doris* and *Hesperomys muriculus* at Água Hedionda and *Graomys griseoflavus* at Floripondio and Água Hedionda.

Ixodides. — *Ornithodoros* sp. as larva on *Lagidium viscaccia* at Monos and on rat. *Ixodes luciae* Senevet 1935 on *Didelphis paraguayensis* and *Culniculus pacca pacca* at Buen Retiro. *Ixodes sp.*, as immature forms, on *Oecomys mamorae*, *Graomys griseoflavus*, *Rattus alexandrinus*, *Galea musteloides* and *Dasyprocta variegata*. *Amblyomma tigrinum* Koch 1844 (sin: *A. maculatum* Koch 1844, *pro parte*) on *Cerdocyon thous*. *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787) on *Dasyprocta variegata*. *Amblyomma calcaratum* Neumann 1899 on *Tamandua tetradactyla*. *Amblyomma nodosum* Neumann 1899 on *Tamandua tetradactyla*. *Amblyomma* sp., immature forms, on *Dasyprocta variegata*, *Olygoryzomys* sp., *Rattus alexandrinus*, *Sigmodon* sp., *Oryzomys* sp., *Hesperomys muriculus*, *Lagostomus maximus* and *Tamandua tetradactyla*. *Hemaphysalis leporispalustris* Packard 1869, on *Sylvilagus brasiliensis paraguayensis* at Buen Retiro and Boyniba.

Eulaelaps halleri (Fonseca 1960) — This species was originaly described from Peru, being a little smaller and not as desenly beset with setae as *E. vitzthumi*. Idiosoma 1100 micra long by 770 micra wide. Genito-ventral plate 460 micra greatest wide, some ten pairs of marginal setae and some fiveteen pairs at the ventral surface of the plate. Anal plate 126 micra long by 154 micra wide. Iguinal plates oval, 112 micra long by 56 micra wide. Dorsal shield not as densely convered with setae as in *Eulaelaps vitzthumi* but with very numerous setae, the largest ones being 70 micra long. Corniculi very strong. *Rima hypopharingis* with eleven series of denticles. Epistoma of the *Haemogamasidae* type with five branchs at each border. Papal sensorial organ capsulated, remembering Haller's tarsal organ of the *Ixodides* and Blumenthal's organ of the *Aranea*, but with five chambers of decreasing size without setae and covered by a fine membran. Two females N.º 3514 from a wild rat, probably *Oryzomys* sp., captured at Padilla. Lot N.º 3480 captured on *Oxymycterus doris* at Valleabajo.

Tur amazonicus sp. n. — Only the female is known. Idiosoma 1330 micra long and 925 micra wide. Strong chitinised; chaetotaxy remembering that of *Laelaps* spp. most setae being strong and long. Sternal plate 126 micra long by 196 micra wide, anterior setae 168, median setae 196 and posterior 140 micra long. Genitoventral and anal plates fused, with greatest wide of 560 micra and four pairs of genitoventral setae, the genital pair being shorter, only 182 micra long, the ventral ones being subequal 210 micra long. Paired anal setae stout, 112 micra long and unpaired one with 160 micra. Dorsal shield 1260 micra long and 910 micra wide. Only the third pair of vertical setae is long and only seven other pairs of submedian setae are seen, the shorter setae (Zachvatkin's S 8) near the posterior marginal being

absent. Fixed finger of the mandibula with two teeth and a non inflated *pilus dentilis; pulvillum* with some 10 pseudosetae at the base of the *digitus mobilis*. Only the most anterior seta of the maxilicoxa is weak. Legs not enlarged. Coxae II and III have posterior spines. Holotype N.º 3464 captured on *Oligoryzomys* sp. at Buen Retiro. Female paratype N.º 3462 from *Graomys griseoflavus* at Buen Retiro. One female from "Water rat", perhaps *Nectomys squamipes*, at Mata de Utinga, Belém, Pará, Brazil, Dr. H. Laemmert capt.

Tur aymara sp. n. — A small species with an idiosoma 770 micra long and stout setae, belonging to the group of *Tur* with an enlarged genitoventral plate separated but allmost reaching the anal plate, as in *Tur aragaoi* Fonseca 1939 (= *L. aragonensis* Fonseca 1939). The stoutness of the posterior setae of the maxillicoxa and of the spines of coxae is not as pronounced as in *aragaoi*. Setae of the ventral plates and of the dorsal shield stout, with the only exception of the anterior vertical ones and of the small submedian posterior pair. Male unknow. Female holotype N.º 3452, captured on *Graomys griseoflavus* at Buen Retiro. Lot 3463 from the same locality on *Oligoryzomys* sp. together with *Tur amazonicus* sp.n.

Gigantolaelaps barrerai sp.n. — A comparatively small species differing from all others of the same genus by the stoutnes and larger size of the posterior setae of the maxillicoxae. The strong spines of tarsus II, the largest with 90 x 24 micra, remember those of *G. brachyspinosus* Fonseca 1939 and of *G. canestrinii* Fonseca. As in *G. oudemansi* Fonseca 1939, *G. gilmorei* Fonseca 1939 and *G. brachyspinosus* the posterior seta of coxa II is not as long as it is usual in other species, mesuring in *G. barrerai* sp. n., only 155 micra. Only coxa III bears a spine, all other coxae presenting setae. The male is also described and figured. Female holotype and male allotype N.º 3465, mounted ventral, captured on *Dasyprocta variegata* at Buen Retiro. Lot 3455 on *Graomys griseoflavus* at Buen Retiro. Lot 3511 on *Oryzomys* sp. at Gutierrez.

Bdellonyssus viscaecia Fonseca 1960 .— A narrow species about 850 micra long and only 380 micra wide, the aspect of the sternal plate very characteristic and unique in the family *Macronyssidae*, the chitinisation of the anterior third of this plate being lost from the level of the anterior pores to the anterior margin. Sternal plate 64 micra long, the weak area included, and half as long without this region, by a smallest wide of 115 micra, with an arched posterior margin. The setae on this plate are subequal, 40 micra long. Presternal plate present. Tritoesterum with short filaments. Genital plate with blunt end. Anal plate 170 micra long by 75 micra wide. Dorsal shield narrowing suddently with a group of three pairs of small posterior setae. First palpal segment with a narrow 22 micra long spur. Male with an undivided holoventral shield and dorsal shield not as abruptly narrowed as in the female; there is no palpal spur in the male. Described from eight females and a male

in two slides, both N.º 3523, captured on *Lagidium viscaccia* at Monos. Species originaly described from Peru.

Schoengastia (Euschoengastia) audyi sp.n. — Engorged larvae with a slightly constricted idiosoma. Podosomatal shield retangular with slightly depressed margins. Punctations more apparent between the pseudostigmata and the antero-median setae. Pseudostimatic organs clavate, elongated, raquette-like. Standard data of this shield as follows:

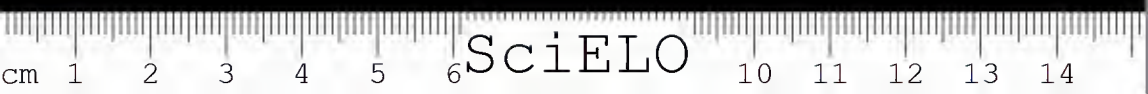
AW — 44 AP — 22 PW — 63 SB — 27 ASB — 25 PSB — 24 AL — 24 PL — 42 ML — 36 micra. Setae of the idiosoma as follows:

Dorsal 2, 6, 6, 6, 6, 4, 4; Ventral 2. 2, 6, 2. 2, 4. 6. 6, 4, 4. 2.

Mandibula with a small ventral teeth and a dorsal one. Galeal seta pectinated. Palpal claw triforked with a longer axial prong and a ventral smaller one. Coxal, femural and genual setae pectinated. Tibial dorsal, ventral and lateral setae pectinated. Legs seven segmented. Tarsus I with apical and subapical nude setae, a median "spur" of the type of Grandjeans's "solenidium" and some 20 pectinated setae. Tibia I with three nude setae, one being solenidium-like and another very short. Tarsus III with 12 pectinated setae and tibia III with a short simple seta and 6 pectinated ones. All coxae with a pectinated seta. Described from the holotype, N.º 3470, captured on *Lagidium viscaccia*, at Monos. Two paratypes N.º 5141 from the same host.

Traghardula traubi sp.n. — Engorged larvae slightly constricted hinder coxae III, pentagonal shield with five setae and filamentous pseudostigmatic organs, eyes present, mandibles smooth, triforked palpal claw, seven segmented legs, without whiplike setae, coxae with one seta, empodium normal. Standard data as follows;

AW — 48 AP — 29 PW — 55 SB — 18 ASB — 22 PSB — 32.5 ML — 30 AL — 22 PL — 30 S — 52.

Dorsal shield pentagonal with slightly depressed anterior and lateral margins. Antero-lateral setae at some distance of the anterior margin and median anterior seta in this margin. Pseudostigmatic organs piliform with filaments only in the distal half. Punctations regularly distributed, scarcer at the sides and hinder the median anterior seta. Dorsal setae: 6, 6, 2, 6, 6. 4, 4, 2. Ventral setae: 2, 2, 6, 6, 6, 4. 4, 2. Galeal seta nude. Palps triforked, with coxal, femural genual and three tibial setae pectinated, the tibial segmented. with comparatively short tarsi. Coxae with only a pectinated seta. Tarsus I with a solenidium, a short apical nude seta and 19 pectinated ones. Tarsus II with an apical nude seta and 16 pectinated ones. Tarsus III with 2 nude and 11 pectinated setae. Tibia I with 3 nude setae, one being a solenidium and one being very short and eight pectinated setae. Tibia II with a solenidium, a nude seta and 6 pectinated ones. Tibia III with a nude seta and 6

pectinated ones. Description from five cotypes N.° 3471 obtained from a *Lagidium viscaccia* at Monos, Bolívia.

Trombicula (*Trombicula*) *whartoni* sp.n. — Engorged larva eliptical, without constriction. Dorsal shield much wider than long, punctations absent around the antero-median seta, posterior margin strongly convex, setae with the same stoutness, sensilae filamentous only at the distal half and implanted at the medium of the distance between the anterior and the posterior margins. Standard data as follow: AW — 68 AP — 23 PW — 79 SB — 36 ASB — 18 PSB — 18 AL — 39 PL — 50 S — 54 AM — 32 micra. Pattern of the dorsal setae: 2: 6: 6: 4: 2: 2. Ventral setae: 2: 2: 2: 4: 2: 2. Mandibles simple. Galeal seta nude. Palpal claw biforked. Palps with coxal femural, genual and lateral tibial (or ventral tibial?) pectinated and dorsal tibial (?) nude. Legs seven segmented. Tarsus I with a nude apical seta, a solenidium and 18 pectinated setae. Tibia I with two nude setae of medium length. Tarsus III with two flagelliform and some ten pectinated setae. Tibia III with a flagelliform and a short setae and four pectinated ones. All coxae only a pectinated seta. Described from the holotype, N.° 3479, captured on *Galea musteloides* at Valleabajo.

The author is indebt to Dr. J. M. de la Barrera and to Dr. Oswaldo Silva of the Panamerican Sanitary Bureau for all the material from Bolivia here studied and obtained by Dr. de la Barrera who send also all informations about hosts and localities. To his old friend the late Prof. H. Aragão, as also to Dr. H. Laemmert, wish the author aknowledge his obligation for the lot of *Tur amazonicus* from Pará.

In the Memórias do Instituto Butantan XXVIII: 99. 1957-1958, appeared in 1959, I have proposed, as a new genus, *Schizolaelaps* having as genotype *Laelaps mazzai* Fonseca 1939. This generic name was however preocuped by *Schizolaelaps* Womersley 1956, created with a male and a female genotypes (*sic*), respectively *Schizolaelaps bolboceras* Womersley 1956 and *Schizolaelaps armstrongi* Womersley 1956. As no genus may have two genotypes, I want to select here *Schizolaelaps bolboceras* Womersley 1956 as genotype of *Schyzolaelaps* Womersley 1956. For the homonymous *Schizolaelaps* Fonseca 1959, with *Laelaps mazzai* Fonseca 1939 as genotype, I am proposing *Schistolaelaps* nom. nov, with the same genotype.

Dr. R. Domrow from the Queensland Institute of Medical Research, recently informed me he had examined a number of specimens of *Eulaelaps stabularis* from North América, Europe and Asia all with a sensory organ on the palpal trochanter. As this species is the genotype of *Eulaelaps*, my genus *Rhinolaelaps* should fall as a synonym as shown by Domrow.

BIBLIOGRAFIA

Baker, E. W. and Wharton, G. W. — An introduction to Acarology. The Mac Millan Co., 1952.

Boshell, J. y Kerr, J. A. — Vienteeinco espécies nuevas de trombidiideos de Colombia. Rev. de Academia Colombiana de Ciências Exactas. Fisico-Qulmicas y Naturales 5: 110. 1942.

Cooley, R. A. and Kohls, G. M. — The genus Ixodes in North América. Nation. Instit. of Health Bul. N.º 841. 1945.

Fonseca, F. da — Novos gêneros e espécies de acarianos parasitas de ratos. *Memórias do Instituto Butantan* X: 17. 1935-1936.

Fonseca, F. da — Notas de Acarologia. XXVI. Novos estudos sôbre o gênero *Laelaps* Koch, 1836. Memórias do Instituto Butantan XII: 103. 1938.

Fonseca, F. da — Notas de Acarologia. XXXI. *Bolivilaelaps tricholabiatus* gen. n., sp.n. (Acari-Laelaptidae). Memórias do Instituto Butantan XIV: 60. 1940.

Fonseca, F. da — Notes d'Acarologie. XLVI. Enquête acarologique au Pérou. Acarologia, Paris 2 (1):1960.

Furman, D. P. and Tipton, W. J. — *Tur uniscutatus* (Turk) 1946 (Acarina. Laelaptidae) from neotropical rodents. The Journ. of Parasit. 49 (5): 541. 1958.

Senevet, G. — Quelques Ixodides de la Guyane Française. VI Congres. Intern. Entom. 891. 1935.

Strandtmann, R. W. and Wharton, G. W. — Manual of Mesostigmatid Mites. University of Maryland. 1958.

Turk, F. — A new genus and two new species of mites parasitic on Muridae. Annals and Magaz. Natural Hist. 11 (13): 347. 1946.

Vitzthum, H. — Terrestrische Acarinen der Deutschen Limnologischen Sunda-Expedition. Arch. f. Hydrobiol. Suppl.-Bd. IX: 59. 1931.

Womersley, H. — The scrub-typus and scrub-icht mites (Trombiculidae, Acarina) of the Asiatic pacific region. Records of the South Australia Museum X: 1. 1952.

Womersley, H. — On some Acarina Mesostigmata from Australia, New Zeeland and New Guinea. Linnean Society's Journal-Zoology XLII (288): 505. 1956.

Zachvatkin, A. A. — Systematika roda Laelaps, etc. Parasit. Sb. Zool. Inst. Akad. Sci. U.R.S.S. Moskwa 10: 51. 1948.

COAGULANT AND FIBRINOLYTIC ACTIVITY OF ANIMAL VENOMS; DETERMINATION OF COAGULANT AND FIBRINOLYTIC INDEX OF DIFFERENT SPECIES (*) (**)

G. Rosenfeld, O. G. Hampe (***) & E. M. A. Kelen (***)

(*Laboratory of Hematology — Instituto Butantan — S. Paulo — Brasil*)

The existence of different activities in snake venom such as blood-coagulating, proteolytic, hemolytic and neurotoxic was recognized for a long time by many researchers. Noc had concluded in 1904 (7), by "in vitro" experiments, that the venom anticoagulant activity was a consequence of its proteolytic activity. By adding venoms to oxalated plasma, he observed that some of them, after having coagulated the plasma, provoked lysis of the clot and this lysis was proportional to the venom concentration. Other venoms inhibited the coagulation of plasma and no posterior clotting could be obtained. In the first case proteolytic enzymes lysed fibrin while, in the latter, these enzymes decomposed fibrinogen before its transformation to fibrin. However in 1909, Vital Brazil and Pestana (1) by experiments on the same subject were able to destroy the proteolytic activity of *Bothrops jararaca* venom on gelatine, by heating 100° C, without damaging the coagulant activity. They inferred that no parallelism existed between the proteolytic and the coagulant activity. This conclusion was confirmed by the observation that some coagulant venoms such as that of *Crotalus durissus terrificus* did not have proteolytic activity on gelatine (1). Besides, these two properties did not keep the same relation in venoms of different species.

The dissociation between the coagulant and the proteolytic action was substantiated by Houssay and Negrete in 1918 (5), who considered these two properties to be distinct from the aglutinant, toxic and hemolytic actions.

(*) This research was done with the aid of National Council of Research (CNPq) and Research Fund of Instituto Butantan.

(**) Presented to the "Symposium on Animal Venoms" of the Brazilian Society of Advancement of Sciences, at the 10th annual meeting of July, 8, 1958.

(***) Fellow of the National Campaign of Improvement of High Level Personal (CAPES).

adding less concentrated venom (5mg/ml) but is immediately followed by lysis of the clot. The proteolytic activity decreases with increasing dilution since this property is weaker than the coagulant one, thus the coagulant activity appearing more neatly. This explains the "zone phenomenon" described by Rocha e Silva (10) with *Bothrops atrox* venom.

This hypothesis can explain the regular "non diphasic" curves obtained with venoms having very weak fibrinolytic activity and relatively evident coagulant action as that of *Crotalus d. terrificus* (white venom) (curve 4 of fig. 1). It also explains the reason why *B. jararaca* venom gave a regular curve after having been heated at 63° C during 5 minutes in M/15 acetate buffer solution, pH 5.0, showing almost absence of another factor (curve 6 of fig. 1). Heating destroys the greatest part of proteolytic enzymes. But a remainder of these substances was evidenced by the small inflexion of the curve and the fibrinolytic capacity when high concentration was used.

At the point where dilutions provoked clotting in 120 seconds, the curves of different venoms were all regular, *i.e.*, the venoms were sufficiently diluted to avoid the proteolytic activity. Therefore this was the clotting time used for determination of the coagulant index (table 1, 2 and 5).

All bothropic venoms and that of *Lachesis muta muta* showed the *B. jararaca* venom curve type. Only the activity varied between the different species (fig. 2). While these venoms showed a "diphasic" curve when a concentration of 1 mg per ml was used, the same concentration of *Crotalus* venoms did not show "diphasic" curves, in spite of having almost the same coagulant activity as some bothropic venoms. With the *Crotalus* venoms a "diphasic" curve was obtained only with concentration of the order of 10 mg/ml indicating a very weak proteolytic activity in these venoms.

The coagulation curves permitted to separate the venoms in 3 groups according to the following criteria:

I — Lack of coagulant activity on oxalated plasma even when there was a certain proteolytic action (*Agkistrodon*, *Micrurus*, table 5).

II — a markedly coagulant activity with small proteolytic action, giving a "non diphasic", practically straight curve (*Crotalus*, fig. 1).

III — marked coagulant and proteolytic activities showing "diphasic" curves (*Bothrops, Lachesis,* fig 2).

Results obtained with venom of young and adult *B. jararaca* showed a marked difference of coagulant activity, this action being higher in the venom of young snakes (curve 4 and 5 of fig. 3), giving a coagulant index as high as 3,92 (table 2).

The influence of ageing on the coagulant property of the venom was observed comparing recent venom used right after having been vacuum dried,

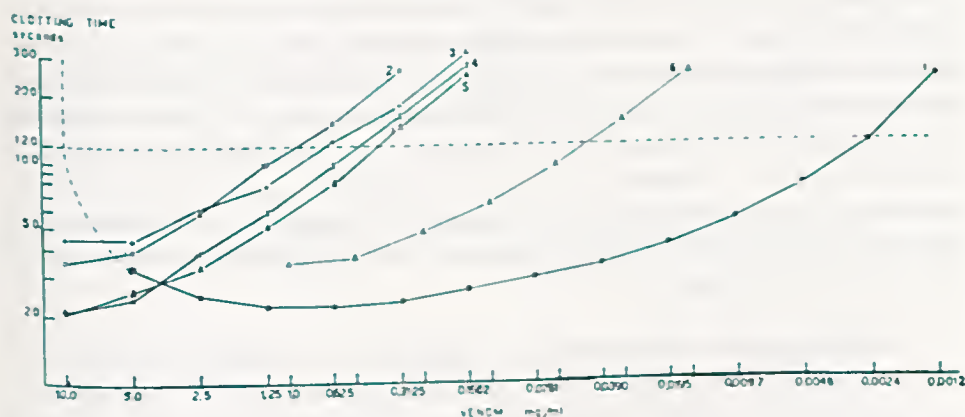



Fig. 1. Relation between venom concentration and plasma clotting time, on log-log scale, obtained with venoms of *B. jararaca* (standard) curve 1; *C. durissus terrificus* (Marajó island) curve 2; *C. durissus durissus* curve 3; *C. durissus terrificus* (white venom) curve 4; *C. durissus terrificus* (yellow venom) curve 5; *B. jararaca* fractionated by heating at 63°C, 5 minutes, pH5.0 curve 6.

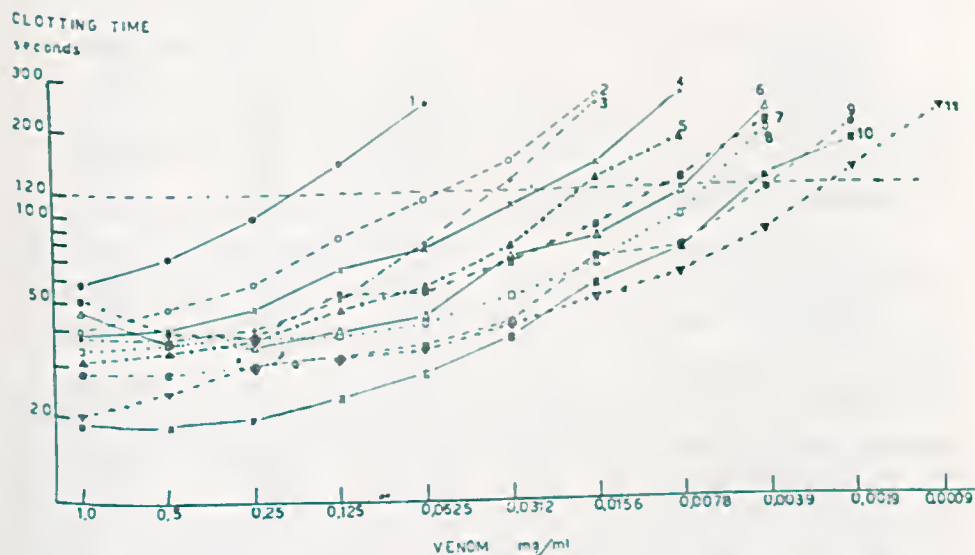



Fig. 2. Relation on log-log scale between venom concentration and plasma clotting time obtained with venoms of many Bothrops species and Lachesis: *B. jararacussú* curve 1; *B. neuwiedi paoloensis* curve 2; *Lachesis muta muta* curve 3; *B. alternatus* curve 4; *B. itapetiningae* curve 5; *B. fonsecai* curve 6; *B. cotiara* curve 7; *B. neuwiedi* curve 8; *B. atrox atrox* curve 9; *B. atrox asper* curve 10; *B. insularis* curve 11.

to dry venoms stored in flasks maintained in the dark, at room temperature, for 3 to 12 years. The curves obtained with these venoms, although demonstrating a progressive decrease of coagulant activity, showed that this activity remained quite marked even after 12 years (curve 1, 2 and 3 of fig. 3). Besides, the curve type was changed in the diphasic zone, which indicates a loss of proteolytic power. However, the slope was observed at lower concentrations where the coagulant property is presumably not affected by the proteolytic one, meaning that the coagulant substance lost its original activity but did not change its character.

TABLE 1. *Coagulant action "in vitro" of snake venoms. Concentration in. γ/ml necessary to provoke the coagulation of plasma in 120 seconds. For tests perfomed in different days the value of standard venom* (B. jararaca) *in the same day was used as reference.*

Clotting time — 120 seconds

Venom	Dilution	Concentration *γ/ml*	Coagulant Index
B. jararaca (standard)	.80	12.5	1,00
B. atrox atrox	.256	3,9	3,20
B. neuwiedi	.155	6,6	1,94
B. fonsecai	.130	7,6	1,62
B. cotiara	.110	9,0	1,37
B. alternatus	.41	24,0	0,51
C. durissus terrificus (yellow venom)	.23.5	42,5	0,29
C. durissus terrificus (white venom)	.4	250,0	0,05
B. jararaca (standard)	.180	5.5	1,00
B. insularis	.410	24.0	2,28
B. itapetiningae	.55	18.1	0,31
Lachesis muta muta	27.5	36.3	0,15
B. jararacussu	.5,1	185,0	0,03
B. jararaca (standard)	.66	15,1	1,00
B. atrox asper	.210	4.8	3,18
B. jararaca (standard)	.110	9.0	1,00
B. neuwiedi paoloensis	.17.5	57,0	0,16
C. durissus durissus	.4.5	220.0	0,04

Tables 1 and 2 summarize the data presented in figure. 1, 2 and 3 in terms of the blood-coagulating index, already described. It can be seen that only snakes of the genus *Bothrops*, such as *B. neuwiedi*, *B. fonsecai*, *B. cotiara*, *B. insularis*, *B. atrox atrox*, *B. atrox asper*, may have stronger blood-coagulating activity than that of the venom of *B. jararaca*. It may also be seen

(table 2) that a venom stored for 24 hours was 2.6 times more coagulant than the standard (stored for eight months), while venoms stored for 2 and 12 years showed 70 and 30 percent of coagulant activity, as compared with that of the standard. It would also seem that the venom of younger snakes has higher blood clotting activity.

TABLE 2. *Comparison of "in vitro" coagulant activity of* Bothrops jararaca *venom after different storage periods and between venoms of young and adult snakes.*

B. jararaca venom	Dilution	Concentration γ/ml	Coagulant Index
24 hours	240	4,2	2,6
8 months (standard)	90	11,1	1.0
2 years	64	15,6	0,7
12 years	23	43,5	0,3
standard (8 months)	125	8,0	1,0
young snake-24 hours	390	2,6	3,12
young snake- 8 months	490	2,0	3,92

The assignated limits of time are refering the storage time of the venom after its extraction.

Table 3 shows the relative activity of venoms of different snake species and of some other poisonous animals.

Fibrinolytic Activity. Determination of fibrinolytic activities of different venoms in a series of dilutions showed 4 curve types:

The first type (type I) with a sigmoid curve (curve 1 of fig. 4). Strongly proteolytic venoms are included in this group, which are able to lyse 4 or more mg of fibrin per mg of venom. *Bothrops jararaca* venom was chosen to exemplify the curve type since bothropic venoms are characteristic to this type. To this group belong the following *Bothrops* showing variable intensities: *jararaca, insularis, atrox, itapetiningae, neuwiedi, neuwiedi paoloensis, fonsecai, jararacussu*, and also *Trimeresurus flavoviridis, Vipera lebetina, Crotalus durissus terrificus* (yellow venom) and *C. durissus durissus* (fig. 5).

The second type (type II) with an exponential curve (curve 2 of fig. 4), were presented by proteolytic venoms, which were able to lyse 2 mg of fibrin per mg of venom. Characteristic to this type was the venom of *Bothrops*

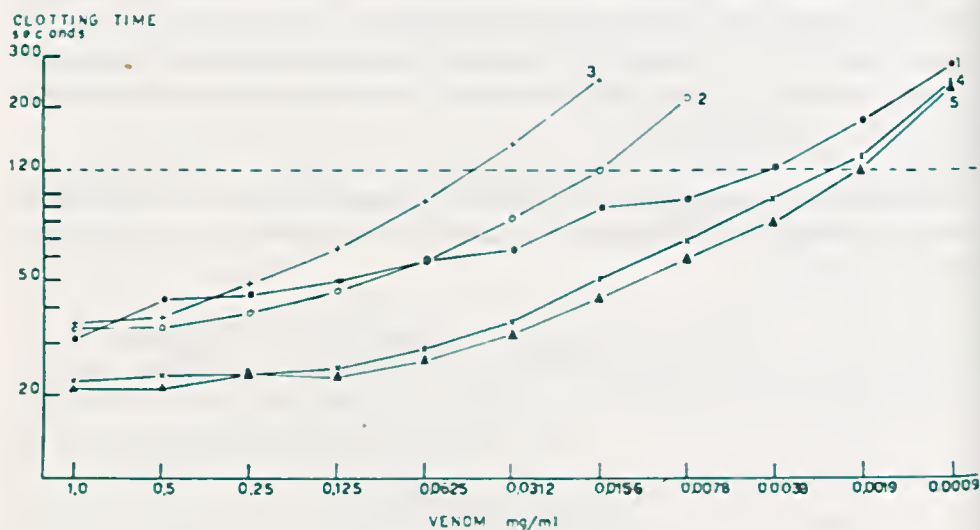



Fig. 3. Influence of the snake age and of ageing of venom on the relation between plasma clotting-time and concentration of *Bothrops jararaca* venom — curves 1,2 and 3 correspond to venoms collected from adult snakes kept respectively for 1 day, 2 and 12 years after extraction. Curves 4 and 5 correspond to venoms collected from young snakes and kept respectively for 1 day and 8 months after extraction.

cotiara belonging also to the group *B. alternatus* and *Lachesis muta muta* venoms (fig. 6).

The third type (type III) with a straight-line relationship between the amount of fibrin hydrolysed and the logarithm of the concentration (curve 3 of fig. 4). The characteristic venom was the one of *Agkistrodon piscivorus* being also included in this group the venom of *Bothrops atrox asper* (Costa Rica) and *Vipera ammodytis montandoni* (fig. 7).

The fourth type (type IV) is that of weakly proteolytic venoms giving the third curve type being however less active (curve 3B of fig. 4). To this group belong the venoms of *Micrurus frontalis*, *Naja naja*, *Vipera russellii*, *Crotalus durissus terrificus* (white venom) and *Crotalus durissus terrificus* of Marajó island (fig 9).

Analysis of fibrinolytic activity curves of *Bothrops jararaca* venom stored for variable periods of time (table 4) showed fundamental differences. The fresh venom, *i.e.*, whose activity was determined right after having been vacuum dried, showed a sigmoid curve of type I (curve 1 of fig. 4, curve 3 of fig 5 and curve 1 of fig. 8). After a little more than 2 months storage it gave

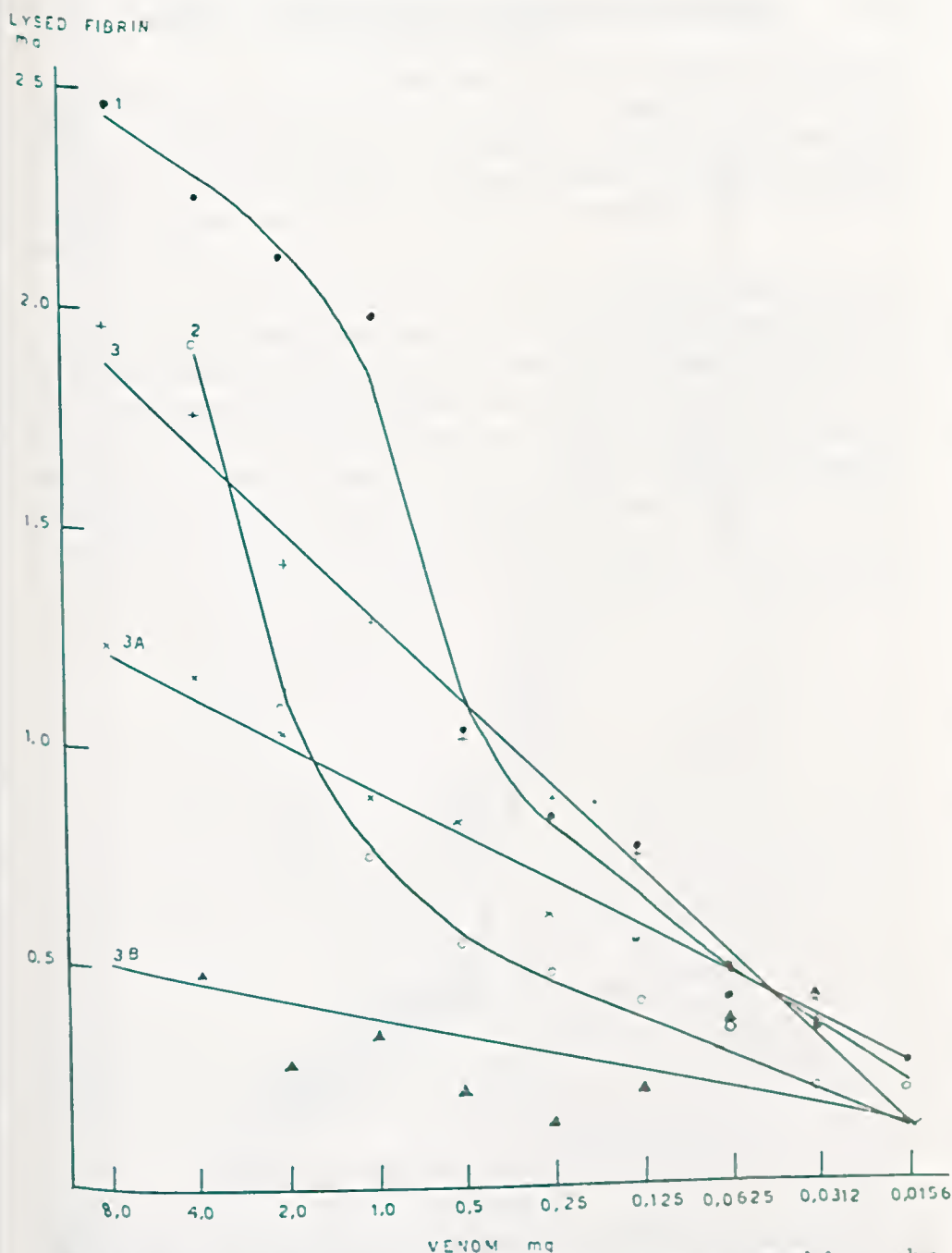



Fig. 4. Types of curves of fibrinolytic activity presented by venoms collected from snakes of different species. Relation between the logarithm of the dosis and the amount of fibrin lysed by the venoms of *B. jararaca* (standard) type I curve 1; *B. cotiara* type II curve 2; *A. piscivorus* type III curve 3; *B. jararaca* stored for 12 years type III curve 3A; *C. durissus terrificus* (white venom) type IV curve 3B.

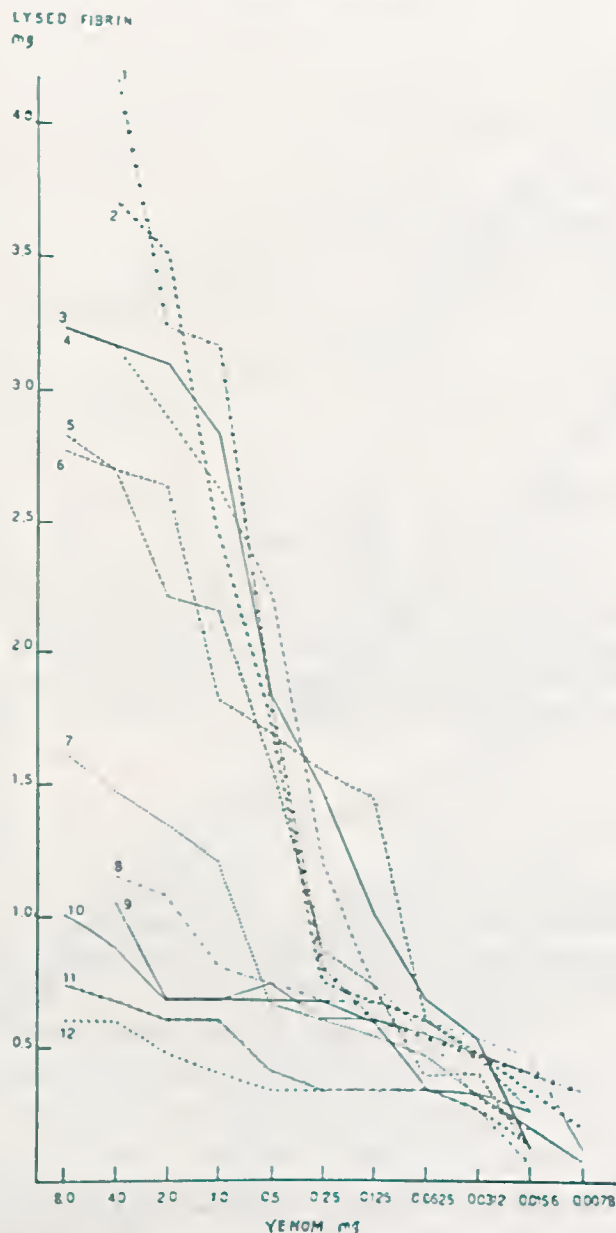



Fig. 5. Relation between the logarithm of the dosis and the amount of fibrin hydrolysed by venoms showing a fibrinolytic curve of type I: *B. atrox atrox* curve 1; *B. neuwiedi* curve 2; *B. jararaca* (standard) curve 3; *B. insularis* curve 4; *B. neuwiedi paoloensis* curve 5; *B. itapetiningae* curve 6; *C. durissus durissus* curve 7; *B. fonsecai* curve 8; *C. durissus terrificus* (yellow venom) curve 9; *V. lebetina* curve 10; *B. jararacussu* curve 11; *T. flavoviridis* curve 12.

the second type (curve 2 of fig. 4 and curve 2 of fig. 8). This curve was maintained up to nearly 3 years (curve 3 of fig. 8). After 12 years the venom showed a curve of type III (curve 4 of fig. 8). These changes suggest that the venom did not lose gradually the same character. Therefore it could be assumed that more labile fractions disappeared remaining only a more stable proteolytic group.

It is to be noticed that the venom of young *B. jararaca* showed a much weaker proteolytic activity than the venom of adults besides giving the type III curve, characteristic of the venoms of adults of the species stored for a long time. After storage the venom had an activity decay (curve 6 of fig 8) but the character of the curve did not change, *i.e.*, it was still of same type. It seems that the venom of young *B. jararaca* does not have all the proteolytic components of the adult's venoms, these components being the two more labile fractions.

The fibrinolytic index of each venom was determined in function of mg

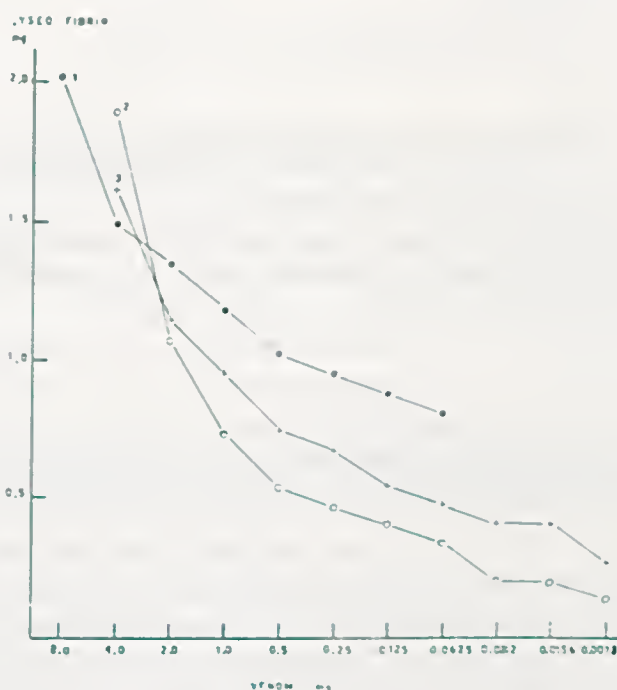



Fig. 6. Relation between the logarithm of the dosis and the amount of fibrin hydrolysed by venoms showing fibrinolytic curve of type II. *L. muta muta* curve 1; *B. cotiara* curve 2 and *B. alternatus* curve 3.

of fibrin lysed by 1 mg of different venoms compared to that lysed by a pooling of *B. jararaca* venom used as standard (table 3, 4, and 5).

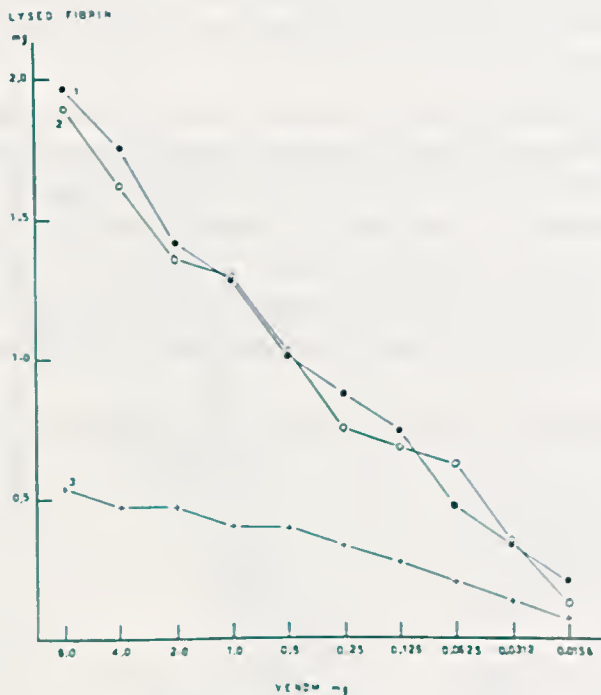



Fig. 7. Relation between the logarithm of the dosis and the amount of fibrin hydrolysed by venoms showing fibrinolytic curve of type III. *A. piscivorus* curve 1; *B. atrox asper* curve 2 and *V. ammodytis montandoni* curve 3.

DISCUSSION

Coagulant and proteolytic activities could be comparatively represented by the described methods, and the calculated index permitted a quantitative appraisal.

A brief analysis of the different coagulant and fibrinolytic index shows very clearly that a venom can be markedly coagulant and have little fibrinolytic activity (*B. cotiara*, young *B. jararaca*), or can have both activities in a high degree (*B. jararaca*, *B. insularis*, *B. atrox*). It can have low coagulant activity being however relatively highly proteolytic(*Agkistrodon piscivorus C. d. durissus*, *B. neuwiedi paoloensis*) or it can be very weak regarding both activities (*C. d. terrificus*, white venom).

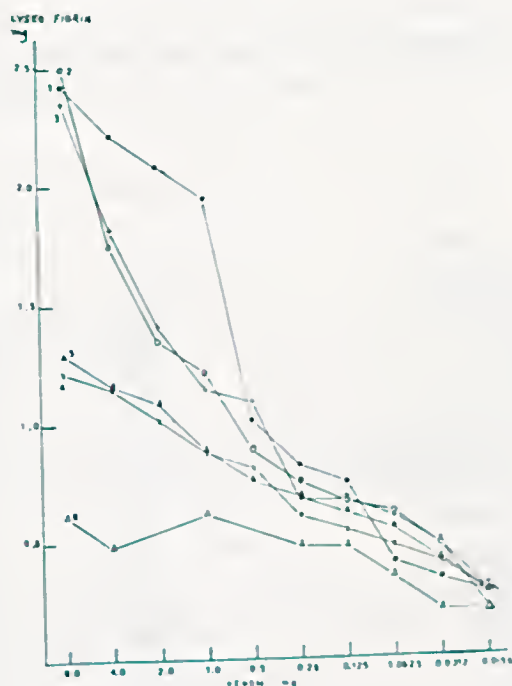



Fig. 8. Influence of the snake age and of ageing of venom on the resulting type of curve of fibrinolytic activity of *B. jararaca* venom. Curves 1, 2, 3 and 4 correspond to venoms collected from adult snakes and kept respectively for 1 day, 8 months, 2 and 12 years after extraction. Curves 5 and 6 correspond to venoms collected from young snakes and kept respectively for 1 day and 8 months after extraction.

This dissociation is a strong argument in favour of the idea that the venom coagulant substance or substances and the proteolytic ones are separate entities, although, most frequently, they are present together in the same venom. The duality of these substances is likewise evidenced by the fact that heating can destroy the greatest part of proteolytic factor or factors, and the coagulant activity remains practically intact (curve 6 fig. 1). If the coagulant activity is due to a proteolytic enzyme, this enzyme must be a different one because even when having high coagulant action it is not able to lyse fibrin. Besides, this enzyme is distinct from those usually called proteolytic. This dissociation already mentioned by Vital Brazil and Pestana (1), Houssay and Negrete (5), Vital Brazil and Vellard (2) Rosenfeld, Hampe and Kelen (13) and others was also confirmed by Henriques, Mandelbaum and Henri-

TABLE 3. *Fibrinolysis "in vitro" provoked by 1 mg of different snake venoms. For tests perfomed in different days, fibrinolysis provoked by standard venom* (B. jararaca) *on same experimental conditions was used as reference.*

Venom 1 *mg*	Lysed Fibrin *mg*	Fibrinolytic Index
B. jararaca (standard)	3,92	1,00
B. atrox atrox	3,17	0,81
B. neuwiedi	2,43	0,62
B. alternatus	0,94	0,24
B. fonsecai	0,81	0,21
B. cotiara	0,74	0,19
C. durissus terrificus (yellow venom)	0,68	0,17
C. durissus terrificus (white venom)	0,34	0,09
B. jararaca (standard)	2,84	1,00
B. insularis	2,63	0,93
B. neuwiedi paoloensis	2,16	0,76
B. itapetiningae	1,82	0,64
B. atrox asper	1,28	0,45
L. muta muta	1,28	0,45
V. lebetina	0,68	0,24
B. jararacussu	0,61	0,21
N. naja	0,47	0,17
T. flavoviridis	0,41	0,14
B. jararaca (standard)	2,50	1,00
C. durissus durissus	1,22	0,49
V. ammodytis montandoni	0,40	0,16
V. russellii	0,31	0,11
B. jararaca (standard)	1,89	1,00
A. piscivorus	1,28	0,68
M. frontalis	0,11	0,22
B. jararaca (standard)	1,22	1,00
C. durissus terrificus (Marajó island)	0,27	0,22

ques (4) who were able to isolate a coagulant fraction from the proteolytic fraction of *Bothrops jararaca* venom.

On the other hand, the coagulant and fibrinolysis curves lead to a qualitative demonstration of new points of view about these two activities in venoms. As it was already stressed, the coagulation curves well demonstrated the interaction of proteolytic and coagulant power, and how dilution permitted to evaluate both activities by means of a simple technique. This method can be useful for choosing the more adequate venom for chemical fractionation of

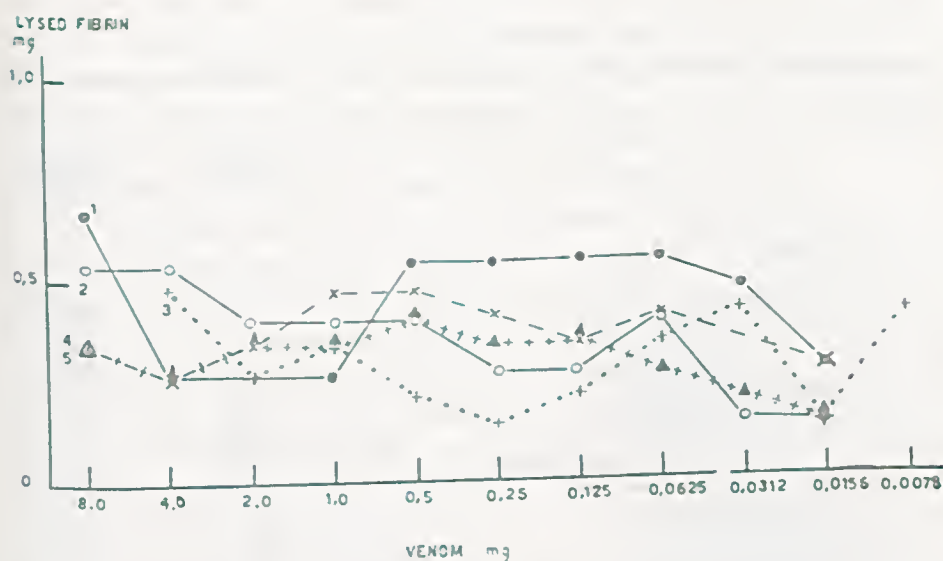



Fig. 9. Relation between the logarithm of the dosis and the amount of fibrin hydrolysed by venoms showing fibrinolytic curve of type IV. *C. durissus terrificus* (Marajó island) curve 1; *M. frontalis* curve 2; *C. durissus terrificus* (white venom) curve 3; *N. naja* curve 4 and *V. russellii* curve 5.

TABLE 4. *Comparison of "in vitro" fibrinolytic activity of* Bothrops jararaca *venom after different storage periods and between venoms of young and adult snakes.*

B. jararaca Venom 1 *mg*	Stored For	Lysed Fibrin *mg*	Fibrinolytic Index
adult snake	24 hours	1,96	1,61
» »	8 months (standard)	1,22	1,00
» »	2 years	1,15	0,94
» »	12 years	0,88	0,72
young snakes	24 hours	0,88	0,72
young snakes	8 months	0,61	0,50

TABLE 5. *Fibrinolytic and Coagulant index of different venoms.*

Venom	Fibrinolytic Index	Coagulant Index
SNAKES		
Bothrops jararaca (standard)	1,00	1,00
» insularis	0,93	2,28
» atrox atrox	0,81	3,20
» neuwiedi paoloensis	0,76	0,16
Agkistrodon piscivorus	0,68	0
Bothrops itapetiningae	0,64	0,31
» neuwiedi	0,62	1,94
» jararaca (young snake)	0,50	3,92
Crotalus durissus durissus	0,49	0,04
Bothrops atrox asper	0,45	3,18
Lachesis muta muta	0,45	0,15
Vipera lebetina	0,24	+
Bothrops alternatus	0,24	0,51
Micrurus frontalis	0,22	+
Crotalus durissus terrificus (Marajó island)	0,22	0,03
Bothrops jararacussu	0,21	0,03
» fonsecai	0,20	1,62
» cotiara	0,19	1,37
Crotalus durissus terrificus (yellow venom)	0,17	0,29
Naja naja	0,17	0
Vipera ammodytis montandoni	0,16	0
Trimeresurus flavoviridis	0,15	0
Vipera russellii	0,14	0
Crotalus durissus terrificus (white venom)	0,09	0,05
SCORPIONS		
Tityus bahiensis	0,17	+
Tityus serrulatus	0,11	0
SPIDERS		
Phoneutria fera	0,25	0
Lycosa erythrognata	0,16	+
FROGS		
Bufo marinus	0,27	+
BEE		
Apis mellifica	0,17	+

+ Clotting only after 12 hours contact

0 Absence of clotting

the different elements. The similarity in the slope of the different coagulation curves at a point where fibrinolysis does not occur anymore permits to assume that the coagulant factor is the same in every snake, varying only its concentration. One can infer also that by storage a venom does not lose a coagulant component, as it happens with the proteolytic activity. There is only a decay of global coagulant activity, the same characters being conserved.

The differences between the types of curves of fibrinolysis may be due to fundamental differences between proteolytic enzymes or to the existence of a different number of proteolytic enzymes in venoms. If the first hypothesis would be correct, the venom should give an identical type of curve after storage. This did not happen. *B. jararaca* venom belonging to type I curve changed to type II and finally to type III. The more reasonable explanation would be that venoms which give type I curves have greater number of different proteolytic enzymes than those giving type II curve, this number being smaller in venoms giving type III and IV curves. Storage of dry venom at room temperature gradually destroys some fractions, leaving more stable fractions that do not decay or disappear. The activity decay would therefore depend on the inactivation of some fractions and not on the gradual activity loss of all of them. Thus the old venom, although having high fibrinolytic activity, would not contain certain fractions existing in the fresh venom. This conclusion should be considered when selecting venoms for the preparation of antivenom serum and in experiments done for the purpose of studying immunological aspects of snake venoms. If antivenom sera are prepared with venoms stored like those used in these experiments, it is possible that they do not have antibodies against these fractions. This might explain the observations of Rosenfeld and Leão (11) that antivenom sera do not prevent necrosis produced by venom of *B. jararaca*, possibly because their sera was prepared with old venoms which might not have the more labile component. However, the same reasoning cannot be applied to the coagulant fraction, because, as it was already discussed, no fundamental differences occur due to time of storage, only diminishing of activity.

It must be noticed that coagulant venoms having little proteolytic activity such as *Crotalus durissus terrificus* venom, do not provoke necrotic lesions, while the highly proteolytic but less coagulant venoms, like the *Lachesis muta muta* one, are only able to provoke necrosis when in high concentration, as has been experimentally observed. Venoms having both activities in high degree are those with high necrotic capacity such as the *B. jararaca* venom. It might be concluded that a venom necrotic capacity depends mainly on the simultaneous presence of the blood clotting and proteolytic enzymes in the venom.

The coagulant factor would produce a barrier by the clot, keeping the venom at site where it is injected. This retention keeps the proteolytic factors highly concentrated at the same site, permitting digestion of the surrounding tissues.

In accidents by poisonous animals, the knowledge of a venom coagulant and proteolytic index might permit to foresee the changes of blood coagulability and the occurrence of necrosis, even if there is no clinical record on such animal accident. It permits also an explanation for the absence of necrosis observed in cases of young *Bothrops jararaca* bite. Rosenfeld, Nahas, Fleury and Cillo (12) after clinical observations at the Vital Brazil Hospital of the Instituto Butantan, have seen that in these cases the blood became rapidly incoagulable. Although this clinical finding corresponds more frequently to a very serious case in accidents with adult snakes, resulting from a high volume venom inoculation and having as a consequence great local reaction and risk of necrosis, in cases of bite by young snake these symptoms failed to appear. Indexes of the young *B. jararaca* venom show that though having very strong coagulant activity, C.I. = 3,92 in relation to that of adults of the same species, C.I. = 1,0 its proteolytic activity is the half in relation to that of adults. This indicates that venoms that provoke more frequently blood incoagulability "in vitro" are the more coagulant ones, acting by defibrination, while the more proteolytic venoms produce the same effect by fibrinogenolysis.

SUMMARY

The parallelism between the coagulant and the proteolytic activity of snake venoms and that of some other species of poisonous animals was investigated.

The results presented in form of coagulant and fibrinolytic index permitted to compare both activities and demonstrated the dissociation existing between them. This lack of correlation between the coagulant and fibrinolytic index of each venom permits to affirm that these activities are due to different substances.

The coagulation graphs showed that the fibrinogenolytic substances interfere with coagulation of plasma produced by the venom. The proteolytic substances are less active, because their inhibiting or delaying activity on clotting time by fibrinogen digestion disappears with dilution, remaining more markedly the coagulant activity.

Venoms with practically no fibrinolytic activity, such as the white venom of *Crotalus durissus terrificus* gave the same straight line relationship between the logarithm of venom concentration and the logarithm of the clotting time, as could be theoretically expected from the action of only one substance or a group of substances. The coagulation graph of *B. jararaca* venom became regular after fractionated at about 60° C, pH 5.0 showing an almost total absence of proteolytic factors. The identity of the coagulation curves of the

different venoms, at a dilution where the proteolytic activity does not interfere with the coagulation, suggests that this factor could be the same substance existing in the different animal venoms with such activity. After storage the *B. jararaca* venom showed a decay of activity without changing the character of its curve, which indicates that no disappearance of components occured.

The fibrinolysis curves obtained were of different types. Some venoms gave a sigmoidal curve, some an exponential one others a straight line relationship. These curves do not depend on the fibrinolytic potency of venom, since the type of these curves depends on the type of venom and not on its fibrinolytic potency, thus suggesting that the proteolytic factor, unlike the coagulant factor, varies in the different species, in some perhaps being only one substance and in others a mixture of proteolytic enzymes in variable number and proportion. After storage the *B. jararaca* venom did not show the same type of curve as would be expected if resulting of only one substance, but gave gradually the simpler types of curves, thus demonstrating a gradual disappearance of proteolytic fractions.

The correlation between the coagulant and the proteolytic properties with the necrotic capacity was discussed with reference to its dependence on the coexistence of both activities.

RESUMO

Foi investigado o paralelismo entre as propriedades coagulantes e proteolíticas de venenos de serpentes e de algumas espécies de animais peçonhentos.

Os resultados apresentados sob forma de índices coagulante e fibrinolítico permitiram comparar as duas atividades e demonstraram a dissociação existente entre as mesmas. Essa falta de correlação entre os índices coagulante e fibrinolítico de cada veneno permite afirmar que se tratam de atividades devidas a substâncias diferentes.

As curvas de coagulação demonstraram que as substâncias fibrinolíticas interferem na coagulação do plasma provocado pelo veneno. A medida que se dilui o veneno, sendo as proteolíticas menos ativas, desaparece a ação impediente ou retardadora por digestão do fibrinogênio e aparece mais nitidamente a atividade coagulante. Venenos pràticamente não fibrinolíticos como o veneno branco de *Crotalus durissus terrificus* apresentaram a mesma relação linear entre o logaritmo da concentração do veneno e o logaritmo do tempo de coagulação e aparentemente igual a uma teórica que seria de esperar na ação de uma só ou um único grupo de substâncias. A curva de coagulação do veneno de *B. jararaca* depois de fracionado a cêrca de 60°C em pH 5,0, passou a apresentar-se regular demonstrando ausência quase total dos fatores proteolíticos. A identidade das curvas de coagulação para os venenos os mais diferentes, nas diluições a partir das quais a atividade proteolítica não interfere, sugere que

êsse fator possa ser uma substância existente nos diversos venenos animais que possuem essa atividade. Após envelhecimento o veneno de *B. jararaca* mostrou apenas uma diminuição de atividade sem modificar a característica da curva, indicando que não há desaparecimento de componente algum.

As curvas de fibrinólise apresentaram alguns tipos diferentes. Certos venenos mostraram uma curva sigmóide, outros curva exponencial e outros ainda retilínea. Essas curvas independem da potência fibrinolítica do veneno, uma vez que o tipo das curvas depende do tipo do veneno e não de sua potência fibrinolítica, o que faz supor que, ao contrário do fator coagulante, o proteolítico varia com as espécies, em algumas talvez sendo uma só substância e em outras sendo uma mistura de enzimas proteolíticos em número e proporções variáveis. Após envelhecimento, o veneno de *B. jararaca* não mostrou o mesmo tipo de curva, como seria de esperar si fosse resultante de uma só substância, e sim passou a dar gradativamente os outros tipos mais simples demonstrando com isso desaparecimento gradativo de fracções proteolíticas, e não simples diminuição dessas substâncias.

A correlação entre as propriedades coagulantes e proteolíticas com a capacidade necrosante foi discutida no sentido de que esta depende principalmente da coexistência das duas atividades.

BIBLIOGRAPHY

1 — Brazil, Vital & Pestana, B. R. — Nova contribuição ao estudo do envenenamento ofídico, Ação coagulante e proteolitica. *Rev. Med. S. Paulo*, 12:439-444, 1909.

2 — Brazil, Vital & Vellard, J. — Action coagulante et anticoagulante des venins. *Ann. Inst. Pasteur*, 42:403-451, 1928.

3 — Eagle, H. — The coagulation of blood by snake venoms and its physiologic significance. J. *Exper. Med.*, 65:613-639, 1937.

4 — Henriques, O. B., Mandelbaum, F. R. & Henriques, S. B. — Blood clotting activity of the venom of *Bothrops jararaca*, *Nature*, 183:114-115, 1959.

5 — Houssay, B. A. & Negrete, J. — Estudios sôbre venenos de serpientes. III. Acción de los venenos de serpientes sôbre las substancias proteicas. *Rev. Inst. Bact. Dep. Nac. Higiene*, 1:341-373, 1918.

6 — Laki, K. — The polymerization of proteins: the action of thrombin on fibrinogen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 32:317-324, 1951.

7 — Noc, F. — Sur quelques propriétés physiologiques des differents venins de serpents. *Ann. Inst. Pasteur*, 18:387-406, 1904.

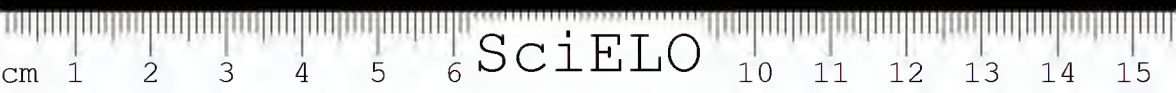
8 — Quick, A. J. — *The physiology and Pathology of Hemostasis*, Lea & Febiger, Philadelphia, 1951.

9 — Rocha e Silva, M. — *Histamina e Anafilaxia*, Gráfica e Editôra Edigraf. Ltda. S. Paulo, 1946, p. 112.

10 — Rocha e Silva, M. & Andrade, S.O. — Estudos sôbre a dicoumarina — 3'-3'-metileno bis-(4-hidroxicoumarina). II. Efeito coagulante de venenos dos generos Bothrops e Crotalus sôbre o plasma oxalatado de animais normais e tratados pela dicoumarina. *Arq. Inst. Biológico*, 16:115-132, 1945.

11 — Rosenfeld, G. & Leão, A. T. — Personal communication

12 — Rosenfeld, G., Nahas, L., Fleury, C. T. & Cillo, D. M. — Envenenamentos por serpentes, aranhas e escorpiões, in Cintra do Prado, F. Ramos, J. e Ribeiro do Valle, J., *Atualização Terapêutica*, Rio, Livraria Luso-Espanhola e Brasileira, 2.ª ed., 1958, p. 1060.

13 — Rosenfeld, G., Hampe, O. G. & Kelen, E. M. A. — Comparação da ação coagulante e fibrinolítica de venenos animais. Determinação dos Índices Coagulantes e Fibrinolíticos, *Ciência e Cultura*, 10:221-222, 1958.

CONTRIBUIÇÃO À BIOLOGIA DO GÊNERO *Eunectes* Wagler, 1830. (Serp. Boidae)

Estudo de seis ninhadas de "sucuris".

Por

H. E. Belluomini A. F. Maranhão Nina* A. R. Hoge

(Secção de Ofiologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

INTRODUÇÃO

Este trabalho reune uma série de dados referentes a ninhadas de "sucuris", serpentes do gênero *Eunectes* Wagler, 1830. (1). Anteriormente relatamos as dificuldades para a captura dêsses avantajados ofídios, em virtude de seu "habitat" ser preferencialmente palustre. O encontro de fêmeas em estado de prenhês é realmente fortuito, de modo que poucos tiveram a oportunidade de observar ninhadas completas. (2 e 3).

O gênero *Eunectes* Wagler, 1830, é representado pelas seguintes espécies:

Eunectes murinus (Linnaeus) (4)
Eunectes notaeus Cope, 1862 (5)
Eunectes barbouri Dunn and Conant, 1936 (6)
Eunectes dechauenseei Dunn and Conant, 1936 (6)

No presente trabalho, apreciamos uma série de ninhadas, reunidas sob diversas condições de trabalho e pertencentes a três das espécies acima descritas: *Eunectes murinus*, *Eunectes dechauenseei* e *Eunectes notaeus*.

MATERIAL

São descritas seis ninhadas

1.ª Ninhada: Em 1952, dois dos autores, Hoge e Belluomini, depararam com um exemplar de *Eunectes murinus*, em uma pequena exposição de animais para fins beneficentes (rua de São Bento, cidade de São Paulo). O exemplar

* Bolsista do Instituto Nacional de Pesquizas da Amazonia e do Conselho Nacional de Pesquizas.

procedia do Rio Quatauau, afluente do Rio Negro, Território do Rio Branco, Brasil. Tratava-se de fêmea e apresentava notável volume corporal, fato êsse que chamou nossa atenção e que nos levou a suspeitar de possível prenhês. Como não fôsse possível um acôrdo monetário que permitisse ao Butantan comprar a serpente, devido a enorme renda que a mesma estava propiciando, o máximo que obtivemos foi a promessa de recebermos o exemplar, caso viesse a morrer brevemente, o que era de se supor, devido ao péssimo ambiente em que se achava instalada. Um mês após (fevereiro, recebemos a comunicação da morte da serpente. Providenciamos ràpidamente a remoção para o laboratório e imediatamente procedemos à necropsia. Deparamos com os ovidutos repletos de filhotes, completamente formados, mas já mortos. Total: 70 filhotes.

2.ª ninhada: foi obtida devido a uma intervenção cesariana (2) que fomos obrigados a praticar em *Eunectes murinus*, com a finalidade de salvar pelo menos os filhotes. A fêmea procedia de Soure, Ilha de Marajó, Brasil, e foi transportada para o Instituto Butantan devido a gentileza do Cel. aviador Ivo Gastaldoni da Base Aérea de Cumbica, São Paulo.

A intervenção realizou-se após ser expelido um filhote morto, pois pouco sabíamos sôbre o desenvolvimento do estado de prenhês. Foram retirados 81 filhotes. Total da ninhada: 82 filhotes.

As ninhadas que se seguem da 3.ª à 5.ª são procedentes de fêmeas de *Eunectes dechauenseei* e foram capturadas por A. R. Hoge e Pedro Vilela, por ocasião da excursão científica realizada entre novembro e dezembro de 1958 à Ilha de Marajó, Brasil.

3.ª ninhada: a fêmea morreu nos viveiros do laboratório e a abertura da cavidade geral permitiu verificar a presença de três filhotes. Total da ninhada: 3 filhotes.

4.ª ninhada: a fêmea abortou sete filhotes já mortos e morreu posteriormente. A necropsia nada apresentou de excepcional. Total da ninhada: 7 filhotes.

5.ª ninhada: a fêmea está viva e passa bem, tendo se adaptado ao viveiro que habita. Expeliu quatro filhotes que foram postos em viveiro especial com outras "sucuris" do 2.º grupo.

6.ª ninhada: fêmea *Eunectes notaeus*, procedente de Aquidauana, M. T. Morreu no laboratório. Apresentava filhotes. Total da ninhada: 13 filhotes.

Os números abaixo mencionados são os da Coleção de Serpentes do Instituto Butantan.

1.ª ninhada. Fêmea: *Eunectes murinus* (Linnaeus). Procedência: Rio Quitauau afluente do Rio Negro, Território do Rio Branco, Brasil. Comprimento do exemplar: 4,45 metros. Número da Coleção: 14091.

Filhotes: machos — 14093 14094 14095 14097 14098 14100 14101 14102 14103 14104 14108 14112 14114 14116 14119 14122 14124 14125 14126 14133 14135 14138 14142 14144 14145 14146 14147 14150 14151 14152 14153 14155 14156 14157 14158 14160 14161.

Total de machos: 37 filhotes.

fêmeas — 14092 14096 14099 14105 14106 14107 14109 14110 14111 14113 14115 14117 14118 14120 14121 14123 14127 14128 14129 14130 14131 14132 14234 14136 14137 14138 14140 14143 14145 14148 14149 14154 14159.

Total de fêmeas: 33 filhotes.

Total geral: 70 filhotes.

2.ª ninhada. Fêmea: *Eunectes murinus* (Linnaeus). Procedência: Soure — Ilha de Marajó, Brasil. Comprimento do exemplar: 5,20 metros. Número da Coleção: 18422.

Filhotes: machos — 17430 17431 17433 17436 17438 17439 17443 17444 17447 17449 17451 17453 17454 17455 17457 17458 17459 17460 17461 17462 17463 17467 17470 17471 17476 17477 17478 17479 17483 17485 17487 17493 17494 17495 17497 17498 17499 17500 17501 17503 17505.

Total de machos mortos: 41 filhotes *

fêmeas — 17429 17432 17434 17435 17437 17440 17441 17442 17445 17446 17448 17450 17452 17456 17464 17465 17466 17468 17469 17472 17473 17474 17475 17480 17481 17482 17484 17486 17488 17489 17490 17491 17492 17496 17502 17504.

Total de fêmeas: 36 filhotes mortos. *

Total geral: 77 filhotes mortos. *

3.ª ninhada. Fêmea: *Eunectes dechauenseei* Dunn e Conant, 1936. Procedência: Tuyuyu — Ilha de Marajó, Brasil. Capturada por A. R. Hoge e P. Villela. Comprimento do exemplar: 1,89 metro. Número da coleção: 17826. Filhotes: machos — 17828 17829. Total de machos: 2 filhotes.

fêmeas — 17827 . Total de fêmeas: 1 filhote. Total geral: 3 filhotes.

4.ª ninhada. Fêmea: *Eunectes dechauenseei* Dunn e Conant, 1936. Procedência: Tuyuyu — Ilha de Marajó, Brasil, Capturada por A. R. Hoge e P. Villela. Comprimento do exemplar: 1,60 m. Número da Coleção: 17804.

* Estes números de coleção dizem respeito aos filhotes mortos. Esta ninhada é a da operação cesariana, descrita em trabalho (2 e 3). Há ainda cinco filhotes vivos. O total geral da ninhada é de 82 filhotes.

Filhotes: machos — 17804 17805 17806 17807 17808. Total de machos: filhotes.

: fêmeas — 17802 17803. Total de fêmeas: 2 filhotes. Total ger 7 filhotes.

5.ª ninhada. Fêmea: *Eunectes dechauenseei* Dunn e Conant, 1936. Pr cedência: Tuyuyu — Ilha de Marajó, Brasil. Capturada por A. R. Hoge P. Villela. Comprimento do exemplar: 1,91 m. Número da Coleção: 177
Filhotes: machos — 17792 17794 * Total de machos: 2 filhotes *.

: fêmeas — 17793. Total de fêmeas: 1 filhote *. Total geral: filhotes *.

6.ª ninhada. Fêmea: *Eunectes notaeus* Cope, 1862. Procedência: Aq dauana — Estado de Mato Grosso, Brasil. Comprimento do exemplar: 2. metros. Número da Coleção: 15159.
Filhotes: machos — 15184 15185 15186 15188 15190 15191 15192 15193. To de machos: 8 filhotes.

: fêmeas — 15187 15189 15194 15195 15196. Total de fêmeas: 5 fill tes. Total geral: 13 filhotes. **

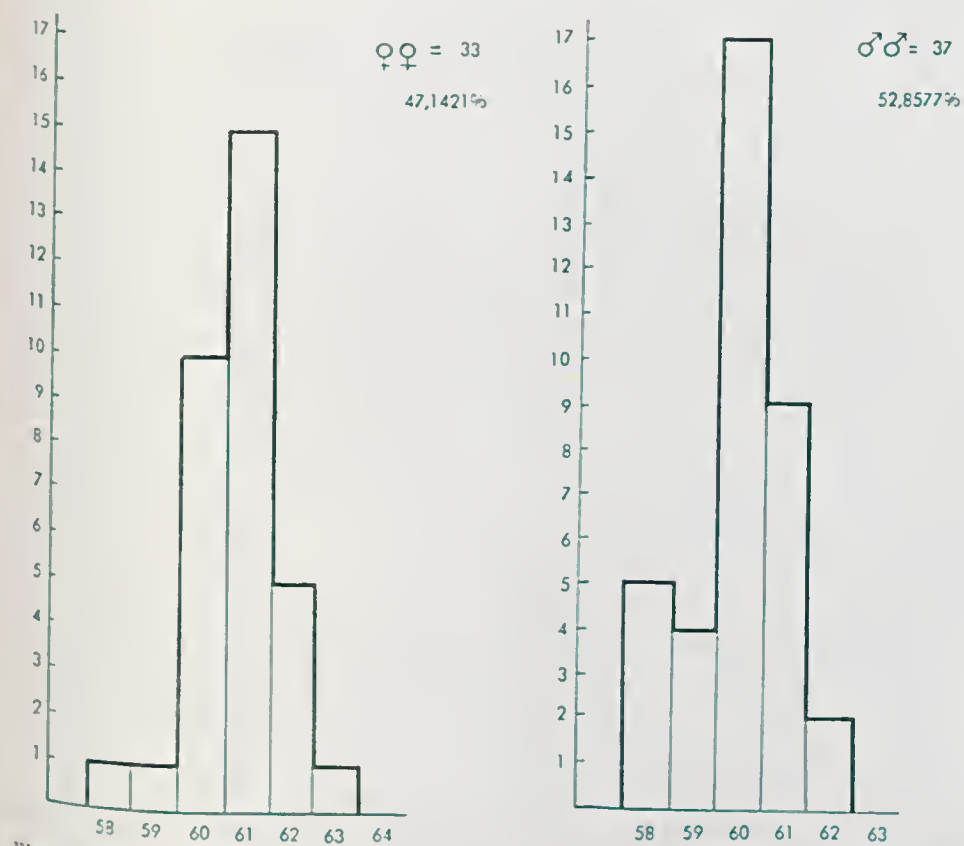
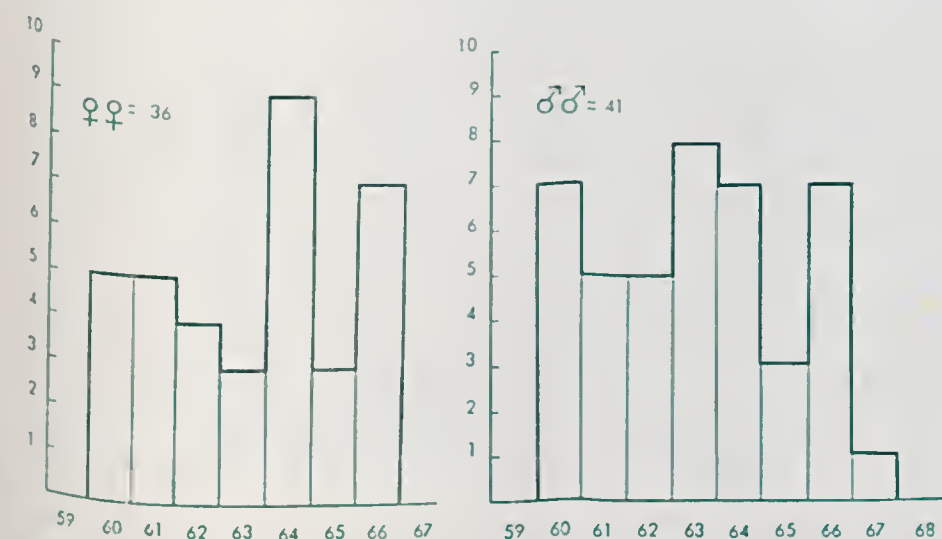
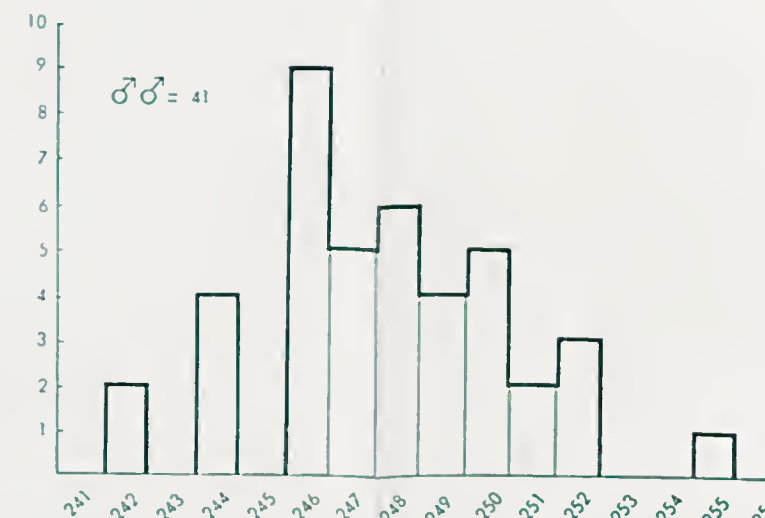
Os filhotes das diversas ninhadas foram comparados dentro de cada grup O quadro I apresenta o número de filhotes examinados, machos e fêmeas sep radamente, porcentagem e dados biométricos referentes ao tamanho da cabeç cabeça mais corpo, cauda e comprimento total. O quadro II apresenta os dad de folidose que interessam a sistemática herpetológica e que são: número escamas dorsais, placas ventrais, placas sub-caudais, placas ventrais e ma subcaudais.

Foram feitos histogramas para maior verificação de detalhes: De 1 a referem-se aos filhotes da chamada ninhada Necrópsia. De 5 a 8 à ninha Cesariana. Para os outros grupos, em virtude do reduzido número de filhot não houve necessidade de grupar os dados.

Em se tratando de filhotes vivos, nascidos da operação cesariana, for pesados e medidos a partir de 18 de maio de 1958. Foram alimentados reg larmente com camondongos. O gráfico 1 revela o crescimento e pêso até presente data.

---

* Esta ninhada é composta por 4 filhotes. Entretanto quando recém-nascidos e co[illegible] em presença, no mesmo viveiro dos filhos da ninhada cesariana, um deles foi com por outro filhote maior de *E. murinus* (Radiografia n.º 1 e n.º 2), caso êsse inédit talvez o primeiro de ofiofagia ocorrido, pelo menos assinalado para com o gênero *Eunec*

** Estes filhotes, embora estivessem perfeitos e completos, devem ser considerados co prematuros, pois a fêmea morreu talvez antes do fim do período de prenhês. Em cada dos [illegible] foi encontrado um ovo atrésico.

Histograma n.° 1 — Escamas Dorsais — Freqüência da distribuição das escamas dorsais dos filhotes fêmeas e machos de *Eunectes murinus* da primeira ninhada (cesariana).

Histograma n.° 2 — Placas Ventrais — Freqüência da distribuição das placas ventrais dos filhotes fêmeas e machos de *Eunectes murinus* da primeira ninhada (necropsia).

Histograma n.° 3 — Placas subcaudais — Freqüência da distribuição d
Eunectes murinus da primeira ni

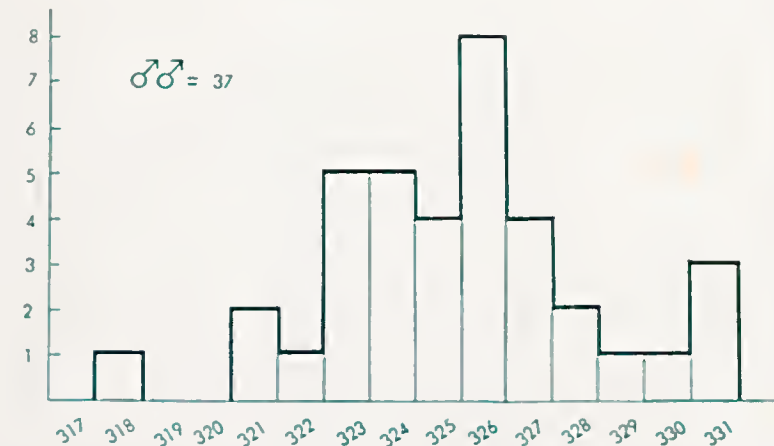
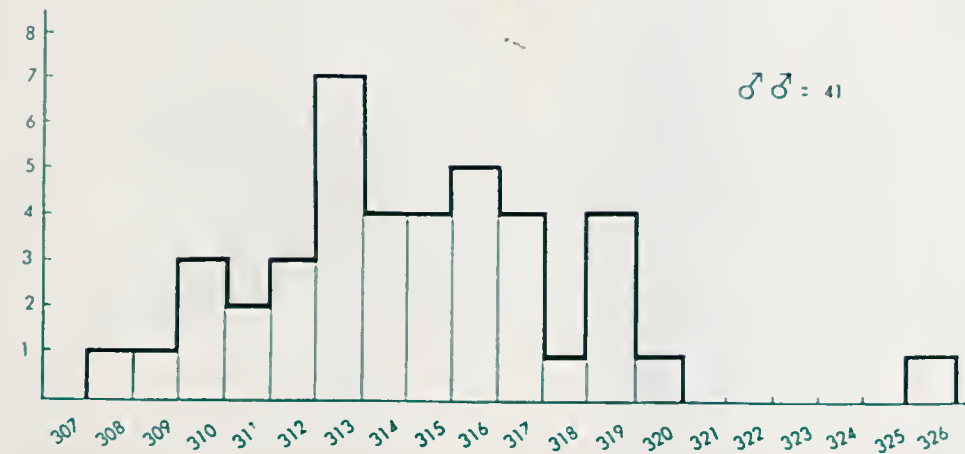
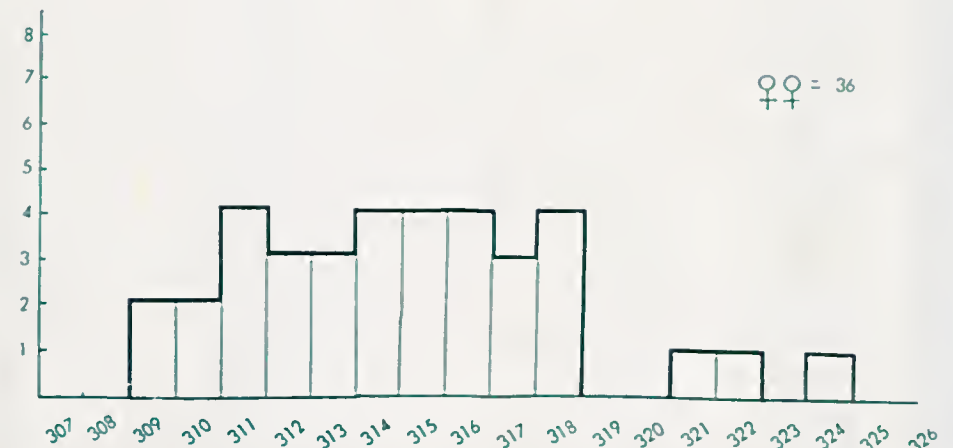
Histograma n.° 7 — Placas Sub-Caudais — Freqüência da distribuição das placas su
ninhada (cesariana)

Histograma n.° 5 — Escamas Dorsais — Freqüência da distribuição das escamas dorsais dos filhotes fêmeas e machos de *Eunectes murinus* da segunda ninhada (cesariana).

Histograma n.° 6 — Placas Ventrais — Freqüência da distribuição das placas ventrais dos filhotes fêmeas e machos de *Eunectes murinus* da segunda ninhada (cesariana).

...lacas sub-caudais dos filhotes fêmeas e machos de ... (necropsia).

Histograma n.º 4 — Placas Ventrais mais Placas Sub-Caudais — Freqüência da distribuição das placas ventrais mais placas sub-caudais dos filhotes fêmeas e machos de *Eunectes murinus* da primeira ninhada (necropsia)

...ais dos filhotes fêmeas e machos de *Eunectes murinus* da segunda

Histograma n.º 8 — Placas Ventrais mais Placas Sub-Caudais — Freqüência da distribuição das placas ventrais mais placas sub-caudais dos filhotes fêmeas e machos de *Eunectes murinus* da segunda ninhada (cesariana).

QUADRO I

DADOS BIOMÉTRICOS Grupo	*E. murinus* (11091) 1.º (70)			*E. murinus* (18122) 2.º (82)			*E. dechauenseei* (17826 3.º (3)			*E. dechauenseei* (17801) 4.º (7)			*E.dechauenseei* (17791 5.º (4*)			*E. notaeus* (15159) 6.º (13)		
Sexo	♀	♂♂	♀♀	♀	♂♂	♀♀	♀	♂♂	♀♀	♀	♂♂	♀♀	♀	♂♂	♀♀	♀	♂♂	♀♀
N.º de exemplares		37	33		41	38		2	1		5	2		2	1		8	5
Porcentagem		52,85	17.11		53,65	16.31		75,00	25,00		71,12	28,57		75,00	25,00		61,53	38,46
Comprimento total (média cms.)	115,0	81,2?4	81,330	520,0	70,875	70,758	189,0	36,05	11,55	160,00	38,70	38,05	191,0	51,05	51,50	252,0	49,0	19,3
Comprimento cabeça (média cms.)		3.270	3,293	111,1	3,097	3,111	5,07	2.17	3,63	5,0	2.19	2.20	5.7	2,50	2,59	7.1	2.46	2.48
Comprimento cabeça + + corpo (média cms.)		68.915	68.864	451	60,675	60,527	139	31.4	36,0	137	33,38	32,0	166,0	46,20	46,60	217	11,72	41,9
Comprimento cauda (média cms.)		12,397	12,167	66 0	10,219	10,258	50,0	5,55	5,55	23,0	5,72	6,05	25 0	7,85	7,90	33,5	7,27	7.18

Os filhotes das diversas ninhadas foram comparados dentro de cada grupo. Na primeira linha estão indicadas as espécies das fêmeas examinadas e os respectivos número de filhotes da ninhada. Fazendo exceção à primeira fêmea do primeiro grupo, tôdas as outras tiveram suas medidas tomadas (1.ª coluna ♀ de cada grupo) para melhor comparação de medidas com os respectivos filhotes.

(*) 1.º filhote foi devorado por uma das "[illegible]" (vide texto)

QUADRO II

ESPÉCIES	*E. murinus 1.ª*			*E. murinus 2.ª*			*E. dechauenseei 3.ª*			*E. dechauenseei 4.ª*			*E. dechauenseei 5.ª*			*E. notaeus 6.ª*		
FOLIDOSE	♀	♂♂	♀♀	♀	♂♂	♀♀	♀	♂♂	♀♀	♀	♂♂	♀♀	♀	♂♂	♀♀	♀	♂♂	♀♀
Escamas dorsais Mínimo Predom. Máximo	— — —	58 60 62	58 61 63	— 64 —	60 63 67	60 64 66	— 48 —	47 48	47 48	— 42 —	39 40	39 42	— 42 —	45 49	— 47 —	— 48 —	47 48	48 48
Placas ventrais Mínimo Predom. Máximo	— — —	217 255 258	218 255 256	— 241 —	212 248 255	242 248 254	224	223 223	222 224	— 228 —	225 229	231 234	— — 228	223 — 225	227	237 —	227 — 236	229 231
ANAL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mínimo Predom. Máximo	— — —	70 72 75	70 72 73	— 62 —	63 67 73	63 66 71	— 52 —	58 58	52 59	— 55 —	53 56	51 53	— 60 —	57 59		— 51	50 60	51 60
Placas ventrais + + sub caudais Mínimo Predom. Máximo	— — —	318 125/326 331	317 326 330	— 306 —	308 313 326	309 315 324	— 272 —	270 271	272 271	— 283 —	280 283		— 288 —	268 270 274	— 274 —	— 291 —	280 295	281 291

Os filhotes das diversas ninhadas foram comparados dentro de cada grupo. Na primeira linha estão indicadas as espécies das fêmeas examinadas e os respectivos números das ninhadas. Fazendo exceção à primeira fêmea do primeiro grupo, tôdas as outras tiveram suas medidas tomadas (1.ª coluna ♀ de cada grupo) para melhor comparação de medidas com os respectivos filhotes.

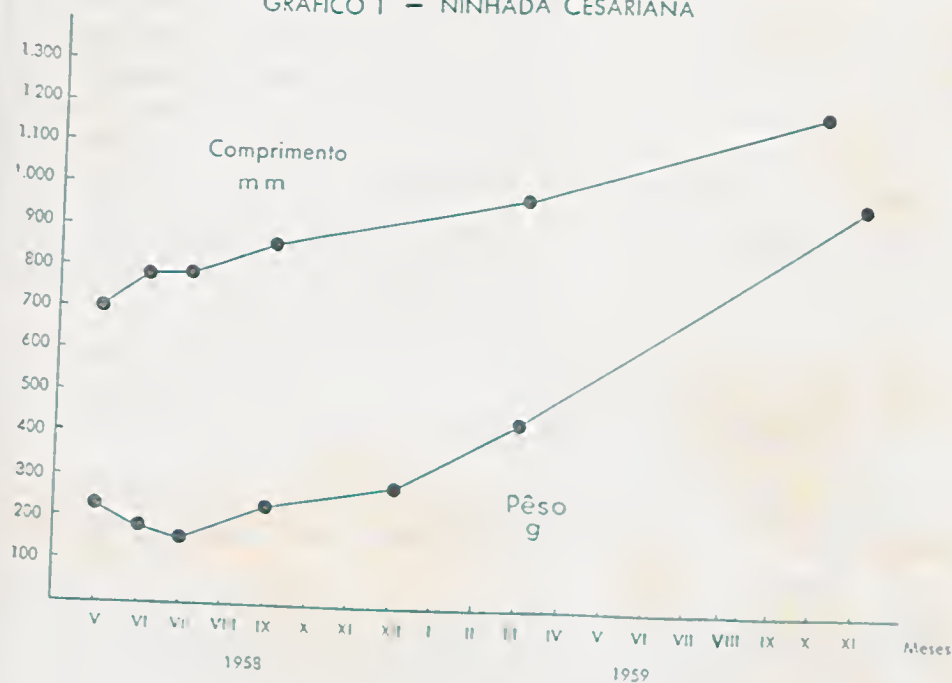



Gráfico n.º 1 — Dados referentes ao *comprimento e peso médio* dos cinco filhotes sobreviventes dos oito filhotes que viviam por ocasião da intervenção cesariana. Os dados dizem respeito a 18 meses de observação.

Os filhotes machos e fêmeas, respectivamente da 1.ª e 2.ª ninhada, estudados estatìsticamente em função de seus comprimento totais, não revelaram diferenças significativas.

Na ninhada da operação cesariana (Grupo II), constatamos a presença de gêmeos vitelinos. São respectivamente os n.ºs 17474 e 17475 da Coleção do Instituto Butantan. Os exemplares são fêmeas e apresentam as seguintes medidas biométricas e de folidose:

n.º	Escamas dorsais	Placas ventrais	Anal	Pl. sub-caudais	Comp. cabeça	Comp. do corpo	Comp. cauda
14474	64	246	1	63	28,5	518	82
14475	65	246	1	64	28,4	495	80

Os comprimentos são referidos em milímetros. O comprimento dos dois exemplares. (590 e 575 mm respectivamente) foi o menor achado, com exceção de macho que tinha 515 mm.

Discussões e conclusões: De acôrdo com os dados observados, o estudo comparativo das seis ninhadas, mostra que as ninhadas de *E. murinus* são formadas por algumas dezenas de filhotes. Para os dois primeiros grupos o número de filhotes é de 70 e 82 respectivamente. A única ninhada de *E. notaeus*, é representada por 13 filhotes. As ninhadas de *E. deschauenseei*, se apresentam diminutas, representadas por 3, 4 e 7 filhotes respectivamente. Devemos levar em consideração a possibilidade de relacionar e proporcionar o tamanho dos exemplares fêmeas com o número e tamanho dos respectivos filhotes, aliás evidente no quadro I. Sòmente observações futuras poderão confirmar essas observações. Por outro lado acreditamos que *E. deschauenseei*, provàvelmente não é espécie que atinja tamanhos avantajados.

Diga-se de passagem que *E. deschauenseei* é conhecido pelo tipo e seis exemplares existentes no Instituto Butantan.

Em se tratando de *E. barbouri*, sòmente conhecemos o tipo e mais um exemplar vivo no I. Butantan.

Interessante é a verificação de que, em tôdas as ninhadas, o número de machos é ligeiramente maior. Embora não seja estatìsticamente significativa, essa preponderância é constante.

Comparando os tamanhos de machos e fêmeas, da primeira e da segunda ninhada, foi verificado não haver diferenças significativas entre os sexos.

Os dados de folidose nada apresentam de extraordinário, estando enquadrados nas respectivas espécies.

RESUMO

O presente trabalho, reune dados sôbre seis ninhadas de serpentes do gênero *Eunectes*, representadas por dois exemplares da espécie *Eunectes murinus* (Linnaeus), três da espécie *E. deschauenseei*, Dunn e Conant, 1936 e um da espécie *Eunectes notaeus* Cope, 1862.

Os exemplares de *E. murinus* (fêmeas), são os maiores, atingindo 5,20 m e 4,40 m, e apresentam maior número de filhotes nas ninhadas. Estes filhotes por sua vez são os maiores. É levantada a hipótese de que o tamanho e número dos filhotes de cada ninhada guarde uma certa proporção com o comprimento da respectiva fêmea. Por outro lado parece evidente que *Eunectes deschauenseei* não atinja tamanhos avantajados, como é o caso de *Eunectes notaeus*. Para *Eunectes notaeus* só há o estudo de um grupo de filhotes.

RESUMÉ

Six nichées de Serpents du genre *Eunectes* sont comparées. Une de *Eunectes notaeus*, trois de *Eunectes deschauenseei* et deux de *Eunectes murinus*.

Les exemplaires de *Eunectes murinus* atteignant respectivement 5,20 m et 4,40 m ont un plus grand nombre de jeunes et taille plus grande. Il n'est

pas impossible qu'il y ait un relation entre la taille de la mère et celle des jeunes, ainsi que le nombre. Mais seulement l'observation de nichées de femelles de taille différente pourra confirmer ou non cette hypothèse.

Il est evident que *Eunectes dechauenseei* et *Eunectes notaeus* n'atteignant pas la même taille que *Eunectes murinus*.

AGRADECIMENTOS

Os nossos agradecimentos ao Dr. A. M. Penha do Instituto Biológico de São Paulo.

BIBLIOGRAFIA

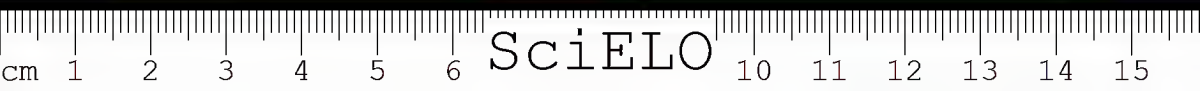
1 — *Wagler, J.* — Natuerliches system der Amphibien. 1830

2 — *Belluomini, H. E. & Hoge, A. R.* — Operação cesariana realizada em *Enectes murinus* (Linnaeus 1758) (Serpentes) — *Mem. Inst. Butantan, 28*:187-194. 1957/1958.

3 — *Belluomini, H. E. & Hoge, A. R.* — Contribuição à Biologia de *Eunectes murinus* (Linnaeu 1758). *Observações* sôbre hábitos alimentares de "sucuris" em cativeiro. *Mem. Inst. Butantan, 28*:207-216. 1957/1958.

4 — *Linnaeus, C.* — Syst. Nat. (10) *1*:215. 1758.

5 — *Cope, E. D.* — Synopsis of the species of *Holcosus* and *Ameiva*, with diagnosis of New West Indian and South American *Calubridae* II *Eunectes notaeus*. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phil.*, 60-82. 1862.

6 — *Dunn, E. R. & Conant, R.* — Notes on anacondas, with descriptions of two new species. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phil.*, 88:503-506. 1936.

Radiografias n.º 1 e n.º 2. — Radiografias evidenciando o caso inédito de ofiofagia ocorrido devido ao fato de um filhote de *Eunectes murinus* (da ninhada cesariana) ter engolido um filhote de *Eunectes dechauenseei* (da quarta ninhada).

BICEFALIA EM *Leptodeira annulata ashmeadii* (Hallowell) 1845 (SERPENTES)

DESCRIÇÃO DE UM TERATÓDIMO DERÓDIMO

por

HELIO EMERSON BELLUOMINI

(Laboratório de Ofiologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

ABDEM RAMON LANCINI

(Departamento de Zoologia, Museo de Ciencias Naturales, Caracas, Venezuela)

Poucas vêzes foram assinalados casos de teratologia em serpentes da Venezuela. Dupouy (1) constatou o primeiro caso em serpente *Bothrops atrox* (L.). Trata-se de um caso de bicefalia, identificado pelo autor, de acôrdo com a classificação de FISCHER (2) como sendo catadidymo.

As bifurcações axiais em serpentes, têm sido assinaladas desde tempos remotos e diversos autores tentaram ordenar, classificar os mais diversos tipos de aberrações existentes nos mais diversos tipos de animais. Dessa forma, uma das classificações que grupou os diferentes monstros foi a de ST. HILAIRE (Hist. des Anom. II. 1838). Mais tarde, FISCHER organizou uma chave dividindo os casos em:

catadidymos — divisão cefálica

anadidymos — divisão caudal

anacatadidymos — divisão nas duas extremidades.

Outros autores, interessados também no assunto, publicaram novos trabalhos, apresentando contribuições, seja na forma de sugestões, novos grupamentos ou simplesmente assinalando novos casos de monstruosidades em serpentes. Podemos destacar dêsse conjunto, os trabalhos de CUNNINGHAM (3) que relacionou vasta bibliografia em novos casos em excelente obra. NAKAMURA (4) relatando também novos casos e apresentando chave de classificação e VANZOLINI (5) que apresentou novo caso, extensa bibliografia e sugestões sôbre o assunto.

Atualmente a chave mais aceita é a proposta por NAKAMURA que, em relação aos teratodimos, é a seguinte:

II. Teratodymos: As individual with a part of body doubled. Duplicitas anterior: Axial skeleton bifurcated anteriorly.

1) Rhinodymus: double nose.

2) Opodymus: Cranium bifurcated, mostly three eyed.

3) Derodymus: Vertebral column bifurcated in the cervical region, doubled headed.

MATERIAL

O presente caso se refere a uma serpente bicéfala, muito jovem, macho, *Leptodeira annulata ashmeadii* (Hallowell) 1845, (6) espécie esta estudada também por ROZE (7-8) e DUELLMAN (9). O exemplar bicéfalo encontra-se depositado no Museu de Ciências Naturales de Caracas, Venezuela, sob n.º Herp. 109, 16/1/1957. É desconhecido o local de procedência, embora venezuelano, assim como o respectivo remetente.

DESCRIÇÃO: — Exemplar jovem, macho, apresentando duas cabeças (Figs. 1-2-3). A descrição é baseada na morfologia externa e através de radiografias (Fig. 4). A serpente é muito jovem; apresenta a 196 mm da extremidade da cauda, pequena protuberância, da qual bifurcam-se dois pescoços, cada qual apresentando uma cabeça. As cabeças nada apresentam de anormal. O exemplar apresenta traumatismo violento na região temporal e mandibular direita, da cabeça direita. O pescoço da direita, coordena-se com o eixo longitudinal do corpo e mede do seu ponto de inserção à extremidade rostral 26 mm; o da esquerda, tem inserção lateral e mede 24 mm. As cabeças têm conformação idêntica, mas tamanhos diferentes: a direita mede 7 mm e a esquerda mede 6 mm. Ambas as cabeças concordam em relação aos dados de folidose:

Lado	S. LABIAL	I. LABIAL	LOREAL	TEMPORAIS
Direita	7 (3.ª e 4.ª em contato com a orbita)	9 (4 primeiras em contato com o 1.º par de gu) lares)	Presente	I + 2
Esquerda	IDEM	IDEM	IDEM	IDEM

Lado	PRE-OCULAR	POST-OCULAR	ROSTRAL
Direita	I	2	larga
Esquerda	IDEM	IDEM	IDEM

Os segmentos bifurcados, impròpriamente chamados de pescoços, apresentam, respectivamente, 3 manchas dorsais, o corpo 35 e a cauda 18 manchas

O número de placas ventrais é de 190 para o lado direito e 187 para o lado esquerdo. Na altura da fusão dos dois segmentos há uma pequena protuberância. Nessa região há dorsalmente fusão do desenho dos segmentos. Ventralmente a fusão dos escudos ventrais se faz de modo ordenado, havendo uma placa aziga, em forma de triângulo, comum a ambos os segmentos. As escamas dorsais apresentam-se ao nível do pescoço em número de 19 e ao nível da região cloacal em número de 15.

EXAME RADIOLÓGICO: — Em se tratando das duas cabeças e das colunas, a radiografia nada apresenta de anormal mas, na altura da fusão das colunas, nota-se uma superposição da direita sôbre a esquerda, advindo daí, provàvelmente, a pequena excrecência que se observa na região dorsal da serpente, ao nível da bifurcação.

Seria interessante considerar a hipótese de que a chamada cabeça e pescoço direito, em função do eixo longitudinal, fôssem os condutores, não passando a cabeça esquerda a respectiva coluna de complemento.

CLASSIFICAÇÃO

De acôrdo com o exposto e proposto por NAKAMURA, o exemplar bicéfalo em estudo é classificado como sendo teradódimo deródimo. Apresenta corpo único, duplicação da parte de seu esqueleto axial anteriormente, com dois segmentos de coluna vertebral, correspondentes em partes às vertebras cervicais e dois crâneos completos e perfeitamente distintos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Srs. Drs. Honorato Faustino de Oliveira Jr. Jair Duarte Rodrigues e ao técnico Olindo Ceccon, as diversas radiografias tiradas no Departamento de Raio X da Faculdade de Medicina Veterinária da USP. Ao Sr. Taufic A. Aued, da Secção de Fotografia do Instituto Butantan, pelo serviço realizado e ao Prof. José M. Cruxent, Diretor do Museu de Ciências Naturales de Caracas, pelas facilidades concedidas.

RESUMO

Nesta nota é descrita uma serpente bicéfala, exemplar de *Leptodeira annulata ashmeadii* (Hallowell) 1845, muito jovem, considerado de acôrdo com a classificação de NAKAMURA, como sendo um teratódimo aeródimo. É o segundo caso de bicefalia em serpente assinalado na Venezuela.

ABSTRACT

This paper deals with a description of a two-headed snake, *Leptodeira annulata ashmeadii* (Hallowell) 1845, young specimen and according to NAKAMURA's classification (1938) as a teratodymus derodymus. It is the second case of two headed snake described in Venenzuela.

BIBLIOGRAFIA

1 — *DUPOUY, W.* — Um caso de bicefalia ofídica en Venezuela. *Bol. del Museo de Ciências Naturales* (II-III) 1,4:55-61 (1956 y 1957) 1958, Caracas, Venezuela.

2 — *FISCHER, G. J.* — 6 — *Diploteratology*. 311 pp. Albany, Estados Unidos da América do Norte.

3 — *CUNNINGHAM, B.* — *Axial bifurcation in serpents*. 177 pp. 1937, Estados Unidos da América do Norte.

4 — *NAKAMURA, K.* — Studies on some double monsters of snakes and tortoises. *Mem. Coll. Sci. Kiyoto Univ.* B 1 4:171-181, 1938, Japão.

5 — *VANZOLINI, P. E.* — Notas sôbre um deródimo de *Crotalus durissus terrificus* (Laur.) *Paps. avulsos do Departamento de Zoologia, 8* (24): 273-283, 1947 São Paulo, Brasil.

6 — *HALLOWELL, E.* — Description of reptiles from South América supposed to be New. *Ac. Nat. Sci. Philadelphia*, 2: 241-250, 1845. Estados Unidos da América do Norte.

7 — *ROZE, J. A.* — Coleccion de reptiles del professor Scorza de Venezuela. *Acta Biol. Venezuelica, I* (5): 93-114, 1952. Caracas, Venezuela.

8 — *ROZE, J. A.* — On Hallowell's type specimens of Reptiles from Venezuela in the Collection of the Academy of Natural Science of Philadelphia. *Ac. Nat. Sci. Philadelphia*, 309: 1-4, 1958.

9 — *DUELLMAN, W. E.* — A monographic study of the colubrid snake genus *Leptodeira*. *Bul. of the Amer. Mus of Nat. History, 114* (1): 1-151, 1958. Estados Unidos da América do Norte.

Foto 1. *Leptodeira annulata ashmeadii* (Vista do exemplar bicefalo)

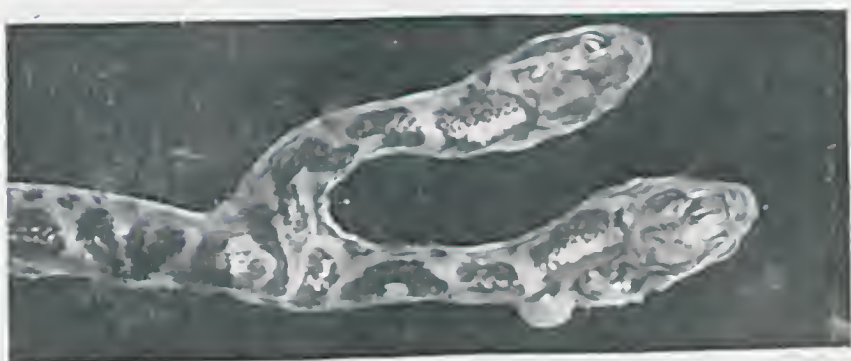



Foto. 2. *Leptodeira annulata ashmeadii* (Detalhes das cabeças do exemplar bicefalo)

Foto. 3. *Leptodeira annulata ashmeadii* (Vista ventral do exemplar bicefalo)

RADIOGRAFIA. I *Leptodeira annulata ashmeadii* (Radiografia do exemplar bicéfalo)

FRACTIONATION OF THE VENOM OF *BOTHROPS JARARACA* BY AMMONIUM SULPHATE. PURIFICATION OF SOME OF THE FRACTIONS OBTAINED *

Olga B. Henriques, Mina Fichman, ** S. B. Henriques
and
Maria C. Ferraz de Oliveira.

(Laboratório de Bioquimica, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

It is well known that the venom of *Bothrops jararaca* shows many enzyme activities [for a review, see Zeller (23) and Slotta (21)]. Only in recent years, however, partial separation of some of these activities have been reported. Holz and Raudonat (14), who compared the proteolytic and blood-clotting activities of fractions obtained from the venom by precipitation with ammonium sulphate, were able to show that the "proteolytic" activity was precipitated at a lower concentration of ammonium sulphate than the blood-clotting activity; the two enzymes involved were called respectively "Protease" and "Koagulin". Hamberg and Rocha e Silva have shown (7 and 8) that heating a venom solution of *B. jararaca* destroys its caseinase activity while not affecting its ability to hydrolyse benzoyl-L-arginine-methyl ester, a finding which indicates that, in this venom, there should be two different proteolytic activities. Henriques, Lavras and Fichman (10) have also presented evidence for the presence of two proteolytic enzymes in the venom of *B. jararaca*, as they separated by precipitation with ammonium sulphate two proteolytic fractions with different specificities. They found that the fraction precipitated at the level of saturation of 0.40-0.50 showed marked caseinase and low benzoyl-L-arginine amidase (BAAmidase) activity, while the fraction precipitated between 0.70 and 0.80 saturation presented high BAAmidase and low caseinase activity. The fraction having higher BAAmidase activity was subsequently purified 52 times as compared to the crude venom (11). This enzyme, which was called *Bothrops* protease A, has no detectable hydrolysing activity on casein, is very

* This work has been supported partly by funds provided by the Instituto Butantan Research Funds.

** With a Brazilian Research Council Fellowship.

active on BAA, and hydrolyses gelatine. After comparing the fibrinolytic and clotting activities of venoms of *B. jararaca* collected and/or kept under different conditions Rosenfeld, Hampe and Kelen (19) also concluded that the proteolytic and blood clotting activities are due to different constituents. The blood-clotting enzyme was studied by Habermann (6) who was able to purify it 10 times and by Henriques, Fichman and Henriques (9) who, by means of electrophoresis on starch column, had concluded that *Bothrops* protease A and the blood clotting enzyme are two separate entities.

This paper reports on the distribution of the toxic activity, the known proteolytic enzymes (caseinase and *Bothrops* protease A), coagulating fraction, 5-nucleotidase and ATPase activities, in the fractions obtained when venom solutions are precipitated with increasing concentration of ammonium sulphate.

MATERIAL AND METHODS

Proteolytic activity. This activity was measured using casein or benzoyl-L-arginine amide as substrate. The caseinase activity was measured by the method of Kunitz (16) as previously described (11). For the BAAmidase activity the method of Schwert, Neurath, Kaufman & Snoke (20) was adapted to the diffusion apparatus of Tompkins & Kirk (22) as described by Henriques *et al* (11). The caseinase and *Bothrops* protease specific activities were calculated as previously described (11).

Coagulating activity. The coagulating activity was measured and the coagulating specific activity calculated as described by Henriques, Fichman & Henriques (9).

Hydrolytic activity on adenosinephosphates. Adenosinetriphosphate (ATP) in the form of the crystalline disodium salt was obtained from Sigma Chemical Co. Adenosine 5-monophosphate (AMP, free acid) was obtained from General Biochemicals Inc. The hydrolytic activity on these substrates was measured by the method of Lowry, Robert, Wu, Hixon & Crawford (17) slightly modified. When testing the hydrolysing activity on ATP, in the mixture buffer-substrate the buffer was substituted by 0.1 M 2-amino-2-methyl-1, 3-propanediol pH 9.2 containing $MgCl_2$ in 2mM concentration. When testing the hydrolysing activity on AMP the buffer used was tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, containing $MgCl_2$ in 2mM concentration. The ATP-ase and 5-Nucleotidase specific activities were calculated by dividing the quantity of inorganic phosphate, liberated by the enzyme from the respective substrate, by the amount of protein contained in the sample.

Toxic activity. Male mice weighing 20-25 g were injected intraperitoneally with the solution to be tested. In all cases 0.05 M cacodylate buffer was used as solvent. All solutions were prepared in such a way that, per g of body weight, all experimental animals included in the same assay were injected with equal volumes of solution. For all quantitative assays 20 mice were used per dosis, the distribution of animals into groups being done with the aid of a table of random numbers. The mortality was recorded up to 24 hours after the injections. All assays were submitted to probit analysis, since a preliminary experiment showed straight-line relationship between the logarithm of the dosis and the mortality in probits (table 3).

The potency ratio was calculated by means of the equation

$$M = \bar{x}_S - \bar{x}_T - \frac{\bar{y}_P - \bar{y}_D}{b} \qquad (1)$$

in which M is the logarithm of the potency ratio; $\bar{x}_S$, the weighed average of logarithm of the dosis of the "standard", which in all cases was the starting material; $\bar{x}_T$ the correspondig value for the "unknown", which usually was a fraction derived therefrom; $\bar{y}_P$ and $\bar{y}_D$ are the weighed average probits recorded for the "standard" and "unknown" respectively and b is the common slope of the two regression lines. Since $\bar{x}_S$ and $\bar{x}_T$ were the logarithm of the dosis in µg/g of respectively the starting material and its fractions, it is easy to see that the anti-logarithm of M is the purification index of the fraction analysed. Therefore

$$I.P. = \text{anti-log } M. \qquad (2),$$

in which $I.P.$ is the purification index. Since the value of g was always higher than 0.1, the equation for the exact fidutial limits (2) had to be used in all assays.

Fractionation of the venom with ammonium sulphate. A 2% solution of the venom in 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH 6.2 was fractionally precipitated with ammonium sulphate. The veuom used was approximately one month old. When collected, it was immediately dried *in vacuo* over $CaCl_2$ at room temperature. The whole procedure of fractionatiou and subsequent dialysis were performed at 5-10°. Solid ammonium sulphate, in small portions, was stirred with the venom solution to give the desired percentage saturation. The amount of $(NH_4)_2SO_4$ uecessary for each case was calculated from the table of Green & Hughes (3). The precipitates were separated by centrifugation, dissolved in a small volume of 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH6.2, transferred to a cellophan tubing and dialysed against the same buffer until the diffusates became free of NH_4^+ ions. The dialysed solutions, when turbid, were centrifuged to separate any precipitate of denaturated protein.

Electrophoresis on starch columns. The same technique as described previously by Henriques *et al* (11) was used, varying the buffer and direction of the electric current in each special case.

RESULTS AND DISCUSSION

The fractionation of the proteins of *B. jararaca* venom with ammonium sulphate from a solution in 0.05 M cacodylate buffer, pH 6.2, permits a partial separation of the coagulant, ATP-ase and 5-nucleotidase fractions. The caseinase fraction is partially inactivated by cacodylate. The *Bothrops* protease A is not altered by this buffer; however for this enzyme a better method of separation was already obtained (11). Table 1 shows that, by precipitation with amonium sulphate from a venom solution in cacodylate buffer as described in this paper, the following activities are partially separated: caseinase, coagulating enzyme, ATP-ase, 5-Nucleotidase and *Bothrops* protease A, between respectively 0.40-0.45, 0.60-0.65, 0.65-0.70 and 0.70-0.80 saturation with ammonium sulphate.

TABLE 1. *Comparison of caseinase, coagulant, ATP-ase, 5-Nucleotidase* and Bothrops *protease A (benzoyl-L-arginineamidase) activities of the various fractions precipitated with ammonium sulphate.*

Relative specific activity is the specific activity of each fraction calculated from the analytical data obtained if the corresponding specific activity (see text) of the starting material is equaled to one.

Fraction	Saturation with $(NH_4)_2SO_4$	Relative specific activities				
		Caseinase	Clotting	ATP-ase	5-Nucleo-tidase	Bothrops protease A
1	None	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2	0.35-0.40	0.9	0.3	—	—	0.3
3	0.40-0.45	1.1	0.7	—	—	0.6
4	0.45-0.50	0.9	0.9	—	—	0.8
5	0.50-0.55	0.4	1.3	0.7	0.4	1.0
6	0.55-0.60	0.2	2.1	1.7	1.0	1.6
7	0.60-0.65	0.2	2.4	3.0	2.7	2.2
8	0.65-0.70	0.2	1.8	0.2	5.0	3.1
9	0.70-0.80	—	—	—	—	4.8
10	0.80-1.00	—	—	—	—	0.7

Proteolytic enzymes. The existance of two proteolytic enzymes has been previously demonstrated in the venom of *B. jararaca* (10). One of them, which we call "caseinase", due to its high hydrolytic power on casein, seems to be the same as the "protease" found in the *Bothrops* venom by Holtz & Randonat (14). Those authors separated the "protease" at 0.40 saturation with ammonium sulphate while Henriques *et al* (10) obtained the fraction most active on casein at 0.40-0.45 saturation with ammonium sulphate. The other proteolytic enzyme identified, *Bothrops* protease A, when purified, has no detectable activity on casein, is very active on L-benzoyl-arginine-amide and hydrolyses gelatine. This last enzyme has been obtained, prepared with an activity approximately 50 times greater than that of the crude venom.

Coagulating factor. Experiments published previously (12), as well as those reported in table 1, indicate that the blood clotting enzyme can be distinguished from the two proteolytic activities known to be present in the venom of *B. jararaca.* The blood clotting activity may, however, be due to a third proteolytic enzyme; this hypothesis has been strengthened by the findings of

Blombäck and Westermarck (1) who found that the clotting of fibrinogen by "Reptilase" (pharmaceutical product distributed by Pentapharm), a preparation of the blood-clotting enzyme obtained from *Bothrops* venom, is accompanied by the liberation of one of the peptides known to be liberated during the action of thrombin on fibrinogen.

ATP-ase and 5-Nucleotidase. The curve of pH — activity (Fig. 1) shows that using the buffers employed by Myers & Slater (18) the activity reached

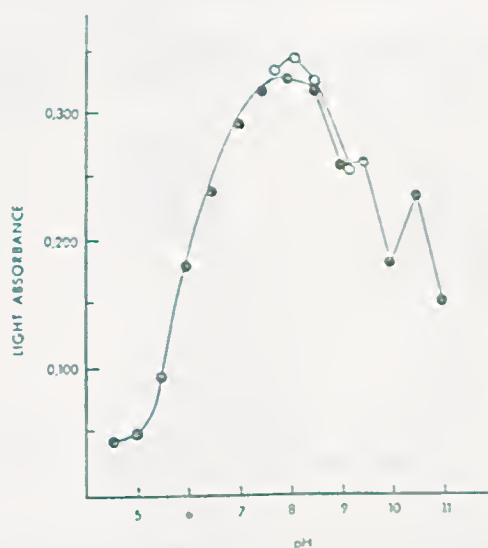



Fig. 1. Relation between pH and the ATP-ase activity of the venom of *Bothrops jararaca.* ●——● with the buffer mixture of Myers and Slater (18). O——O with 0.1 M ammediol buffer mixture containing $MgCl_2$ at the final concentration of 0.002 M.

a plateau at pH 9.0-9.5, decreasing at higher pH values. These values are similar to those of Zeller (22) who reported an optimal pH range of 8.3-9.5. Using 0.05 M ammediol, the pH optimum was found to be also around 9.0. The pH optimum found for 5-nucleotidase, using either the buffers of Myers and Slater (18) or 0.05 M tris-HCl buffer, was 8.0 (Fig. 2). This value is similar to the pH optimum found by Gulland and Jackson (4) for the 5-nucleotidase of Russel's viper venom, using diaethyl-barbiturate and borate buffers. ATP-ase and 5-nucleotidase proved to be thermolabile as they are completely destroyed when the venom solution is heated to 87° in 0.05 M cacodylate buffer, pH 6.2. As mentioned before ATP-ase is partially separated from 5-nucleotidase by fractional precipitation with ammonium sulphate, being precipitated together with the coagulating enzyme. The ATP-ase can be sepa-

rated from the last enzyme by electrophoresis on a starch column in 0.05 M cacodylate buffer, pH 6.2; under these conditions the coagulating enzyme and ATP-ase migrate in opposite directions, an 8-fold purification of ATP-ase being obtained. When the venom is fractionated with ammonium sulphate, the fraction containing 5-nucleotidase is very active on BAA. However 5-nucleotidase can be separated from BAAmidase by electrophoresis in a starch column in the same conditions described for ATP-ase, the 5-nucleotidase migrating towards the cathode, while *Bothrops* protease moves anodically.

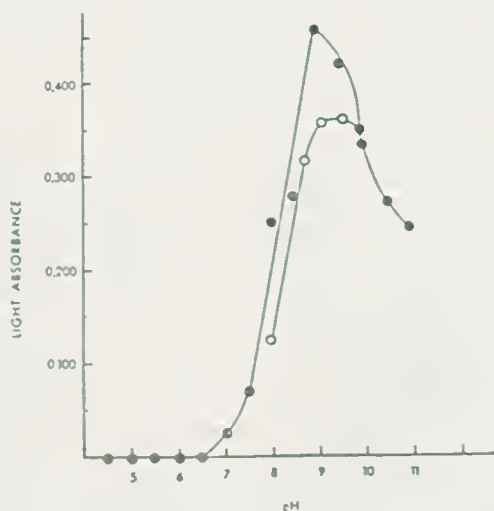



Fig. 2. Relation between pH and the 5-nucleotidase activity of the venom of *Bothrops jararaca*. ●——● with buffer of Myers and Slater (18). O——O with 0.1 M Tris buffer mixtures containing $MgCl_2$ at the final concentration of 0.002 M.

It must be noted that it seems easier to obtain 5-nucleotidase free from ATP-ase than vice-versa, since the fraction with highest ATP-ase specific activity (3 times as active as the starting material) had a 5-nucleotidase specific activity 2.5 as high as the original venom; on the other hand, the fraction with highest 5-nucleotidase specific activity (5 times as high as the starting material) had an ATP-ase specific activity 1/5 of that of original venom. Therefore, all our ATP-ase fractions contained 5-nucleotidase, a circunstance which does not allow us to exclude the possibility of ATP-ase of *Bothrops* venom being a β-γ- adenosine-triphosphatase, as found to be the case for the ATP-ase of cobra venom (15).

Toxic activity

Results published previously had shown (13) that, when the venom of *B. jararaca* is fractionated with ammonium sulphate under the conditions des-

cribed in this paper, the most toxic fractions are precipitated at the levels of saturation of 0.40-0.45 and 0.45-0.50. On the other hand, the fractions precipitated at levels of saturation below 0.35 or over 0.60 are much less toxic (table 2). In view of these results, experiments were made in order to measure accurately the toxicity of fractions obtained with the purpose of studying the yield and the degree of purification.

TABLE 2. *Comparison of the toxic activity of various fractions precipitated with ammonium sulphate.*

The toxic activity was assessed by the proportion of animals killed when 5 mice were injected with each fraction. In all cases the dosis administered was the same, as judged from the amount of protein injected.

Fraction n.°	Saturation with $(NH_4)_2SO_4$	Proportion of animals killed*
1	None	4/5
2	0–0.30	0/5
3	0.30–0.35	0/5
4	0.35–0.40	1/5
5	0.40–0.45	3/5
6	0.45–0.50	5/5
7	0.50–0.55	1/5
8	0.55–0.60	0/5
9	0.60–0.65	1/5
10	0.65–0.70	0/5
11	0.70–0.80	0/5

* The denominators represent the number of mice used in the assay.

Relationship between the dosis of Bothrops *venom and mortality rate.* LD_{50} of the venom was measured in mice. For this purpose two assays were made, one on female and the other on male mice; the results of these assays are presented in table 3. From the non significant values of χ^2 obtained, it was concluded that a straight-line relationship may be assumed to apply between the logarithm of the dosis and the mortality in probits. The female

mice seemed to be slightly more "heterogenous" than the male ones since the values of χ^2 obtained were 2.27 and 0.68 respectively. The values of LD_{50} obtained were 4.81 $\mu g/g$ for females and 8.15 μg for males. While this seems to indicate that the male mice are more resistant to the venom than the males, it must be mentioned that the two assays were made in different days and no steps were taken to fix the progeny of the animals used in these experiments: therefore no definite conclusion can be drawn from the data from table 3 in this respect.

TABLE 3. *Determination of the L. D_{50} of* Bothrops *venom in mice.*

For each assay 80 animals were distributed into 4 groups of 20, with the aid of a table of randon numbers. The venom solutions were administered intraperitoneally, each animal receiving the same volume per g. of body weight. The dosis are expressed in terms of protein administered. The mortality rate registered is the mortality observed up to 24 hours after the injections.

Assay no.	Group no.	Dosis µg/g	Mortality rate %	Mortality rate Empirical probit	Results of probit analysis
I	1	6.03	5	3.36	$\chi^2[2]=0.680(0.95>P>0.50)$
	2	6.87	10	3.72	$LD_{50}=8.15$ µg/g
(Male mice)	3	7.83	45	4.87	Fiducial limits 7.67-8.65
	4	8.93	75	5.67	
II	1	5.70	45	4.87	$\chi^2[2]=2.27(0.50>P>g0.10)$
	2	6.50	70	5.52	
(Female mice)	3	7.40	65	5.39	$LD_{50}=4.81$ µg/g
	4	8.40	90	6.28	Fiducial limits 3.54-6.63

Fractional precipitation of the toxic activity. Table 4 gives the results of an assay of the toxicity of fractions separated from *Bothrops* venom by precipitation with ammonium sulphate. It can be seen that the crude venom (sample 1) gave mortality rates of 50% and 70% for the dosis of 4.67 $\mu g/g$ and 5.60 $\mu g/g$ respectively. At the dosis 2.98 $\mu g/g$ the fractions precipitated at the levels of saturation of 0.40-45 (sample 2) and 0.45-0.50 (sample 3) gave mortality rates of 35 and 40% respectively, while at the higher dosis of 3.58 $\mu g/g$ both fractions produced mortality rates of 70%. Finally, the

observed mortality rates with the fraction precipitated at 0.50-0.55 (sample 4) saturation were 45 and 75% for the dosis of 3.58 μg/g and 4.30 μg/g respectively.

TABLE 4. *Assay of toxicity of fractions obtained from* Bothrops *venom by fractional precipitation with ammonium sulphate.*

A total of 160 mice were used in this assay. The animals were divided into eight groups of 20 mice with the aid of a table of random numbers. For each sample 40 mice were used, 20 of which receiving a lower, while a second group of 20 received a higher dosis of the material. The ratio higher/lower dosis was the same for all samples. The animals of any group received the same volume of solution administered intraperitoneally and were observed for 24 hours after the injections. The dosis are expressed in terms of protein.

Sample no.	Description	Dosis μg/g	Mortality rate %
1	Starting material*	4.67 5.60	50 70
2	0.40-0.45 fraction	2.98 3.58	35 75
3	0.45-0.50 fraction	2.98 3.58	40 75
4	0.50-0.55 fraction	3.58 4.30	45 75

* Crude venom

These data were submitted to a probit analysis in which the potency of samples 2, 3 and 4 was compared with that of the crude venom (sample 1). It was found (table 5) that one mg of protein of samples 2 and 3 were as toxic as about 1.5 mg of protein of the starting material, while 1 mg of sample 4 was as active as 1.3 mg of protein of the latter. It would therefore appear that the material precipitated between 0.50 and 0.55 saturation with ammonium sulphate is less active than the proteins precipitated between 0.40-0.45 or 0.45-0.50 of saturation. A definite conclusion, however cannot be drawn from the data obtained since there was some overlapping on the confidence limits ($P = 0.80$). Under these circunstances the difference in potency of samples 2 and 3 cannot be regarded as statistically significant, since the probability of the found difference being due to chance is about 0.10. It must also be noted that the two most toxic fractions (samples 2 and 3) contained 47 per cent. and the three fractions combined had 61 per cent. of the total original toxicity of the venom.

TABLE 5. *Results of probit analysis of data included in table 4.*

The toxicity of samples 2, 3 and 4 was compared with that of the material fractionated (sample 1, table 4). Accordingly the potency ratio, obtained by probit analysis, was taken as the index of purification (see text).

Fraction precipitated at	χ^2	Probability of χ^2	Value of g	Index of purification	Fiducial limits of the potency rate		Yield %
					P=0.95	P=0.80	
0.40-0.45	0.80	0.50>P>0.10	0.507	1.517	1.21-1.79	1.36-1.67	23
0.45-0.50	0.03	0.95>P>0.50	0.612	1.541	1.19-1.87	1.38-1.70	24
0.50-0.55	0.23	0.95>P>0.50	0.740	1.301	0.92-1.74	1.17-1.46	13
					Total		60

Reprecipitation of the toxic activity. A reprecipitation of the most toxic fractions with ammonium sulphate was tried in order to obtain further purification. For this purpose, a fraction prepared under the conditions specified for sample 2 (table 4) was refractionated with ammonium sulphate in the usual way in order to obtain separately the material precipitated at the level of saturation of 0.40, between 0.40 and 0.45 and between 0.45 and full saturation. The resulting fractions were compared with the starting material (similar to sample 2, table 4) by means of three biological assays, the results of which are condensed in table 6. The same dosis of 2.80 μg/g and 3.64 μg/g of the starting material was used in all three assays, while the dosis (μg/g) for samples 2 (fraction precipitated at 0.40 of saturation), 3 (fraction soluble at 0.40 of saturation and insoluble at 0.45 of saturation) and 4 (fraction soluble at 0.45 of saturation but insoluble in saturated solution of ammonium sulphate) were respectively 2.92 and 3.64; 2.17 and 2.82; 2.92 and 3.80. It can be seen (table 6) that the observed mortality rates in percent were: a) for the starting material, 40 and 75 in assay I, designed to measure the potency of the fraction precipitated at 0.40 saturation, which produced a mortality rate of 45 and 90; b) for the material precipitated between 0.40 and 0.45 saturation, 40 and 85, while the mortality rates observed for the starting material were 15 and 65 (assay II); c) mortality rates of 15 and 60 for the fraction precipitated between 0.45 and full saturation, while the mortality rates recorded for the starting material were 30 and 70%.

TABLE 6. *Assays of toxicity of fractions obtained from a fraction similar to sample 2* (table 3) *by fractional reprecipitation with ammonium sulphate.*

Sample 1, similar to sample 2 of table 4, is the material present in *Bothrops* venom which is precipitated with ammonium sulphate at the level of saturation of 0.45 while being soluble at the level of 0.40 of saturation. Samples 2, 3 and 4 are obtained from this starting material by fractional reprecipitation with ammonium sulphate.

The assays were made under the conditons specified on table 4.

Assay no.	Sample no.	Description	Dosis µg/g	Mortality rate %
I	1	Starting material*	2.80 3.64	40 75
	2	0.40 fraction	2.92 3.80	45 90
II	1	Starting material*	2.80 3.64	15 65
	3	0.40-0.45 fraction	2.17 2.82	40 85
III	1	Starting material*	2.80 3.64	30 70
	4	0.45-1.00 fraction	2.92 3.80	15 60

* Similar to sample 2 (table 4).

When these results were submitted to probit analysis, it was found (table 7) that the fraction precipitated between 0.40 and 0.45 saturation, the most active, had a toxic potency 1.5 higher than the starting material, and that its potency was found to be significantly higher than either that of the fraction precipitated at 0.40 saturation or that of the material precipitated between 0.45 and full saturation. It can also be seen that the total yield of the fraction was 75 per cent, 18 per cent of which is included in the most active fraction.

Since the first precipitation lead to a 1.5 times purification of the toxic fraction (table 5), and the second caused a purification of similar order (table 7), it should be expected that two successive precipitations with ammonium sulphate should permit the preparation of a toxic fraction 2.3 times more potent than the starting material with an overall recuperation of about 8 per cent of the toxic activity in the most potent fraction.

Comment on the use of mice for the quantitative determination of toxicity of fractions obtained from Bothrops *venom.* In the course of the experiments

TABLE 7. *Results of probit analysis of data included in table 6.*

Te toxicity of samples 2, 3 and 4 was compared with that of the material fractionated (sample 1, table 6). The index of purification is the potency ratio obtained by probit analysis (see explanation of table 5).

Fraction reprecipitated at	χ^2	Probability of χ^2	Value of g	Index of purification	Fiducial limits of the potency ratio	Yield %
0-0.40	0.05	0.95>P>0.50	0.200	0.97	0.86-1.10	38
0.40-0.45	0.10	0.95>P>0.50	0.208	1.48	1.32-1.75	18
0.45-1.00	0.17	0.95>P>0.50	0.269	0.88	0.82-1.15	19
					Total	75

described here it was found that the sensitivity of the mice, raised in this Institute, to *Bothrops* venom, presented considerable variation from batch to batch. This can be seen from the results of the assays included in table 6 and which were already described; in these assay the same starting material (sample 1) was administered to mice on three different occasions at the dosis levels (μg/g) of 2.80 and 3.64. The mortality rates in per cent were: a) for the lower dosis 40 (assay I), 15 (assay II) and 30 (assay III); and b) for the higher dosis 75 (assay I), 65 (assay II) and 70 (assay III).

For this reason, the quantitative estimation of the toxic potency of fractions obtained from *Bothrops* venom may be time-consuming, since, quite often, several preliminary trials are required in order to chose the best dosis for the final assay. Since this involves also expenditure of material which may be scarce, it seems quite clear that mice should not be used for the fractionation of small amounts of venom.

Sometimes heterogeneity in the same batch is also found. This can be seen in table 8, which summarizes the results obtained in the course of three assays designed for the determination of the potency of sample 2 (tables 6 and 7). While considerable variability between assays is immediately seen, the χ^2 validity test has shown heterogeneity in the batch used in assay III.

Finally the high value for g, obtained in all assays (tables 5, 7 and 8), constitutes another disadvantange of the utilization of mice for the assay of the toxicity of *Bothrops* venom and its fractions. All these considerations cast some doubt on the data based on experiments in mice done with the purpose of obtaining information concerning small scale preparation of the

toxic fraction of this venom. This conclusion is specially true for the separation by paper electrophoresis which seriously limits the amount of material available for the assay.

TABLE 8. *Variability in the sensitivity of mice to the toxic fraction of the venom of* Bothrops jararaca.

The experimental conditions are the same as described in preceding tables. The "standard" is sample 1 of table 6. S_1 and S_2 represent the lower and higher dosis of the standard (2.80 and 3.64 μg/1 g). T_1 and T_2 stand for the lower and higher doses of sample 2 of table 6. (2.92 and 3.80 μg/g.)

Assay no.	Mortality rates % "Standard"		Sample 2		Results of probit analysis				Fiducial Limits
	S_1	S_2	T_1	T_2	χ^2	Probability	g	Potency ratio	
I	45	75	65	75	1.16	0.5>P>0.1	0.839	1.50	0.33 - 2.01
II	15	65	40	85	0.10	0.95>P>0.50	0.208	1.50	1.32 - 1.75
III	40	90	55	65	4.52	0.05>P>0.01	0.520	1.60	1.11 - 1.97

SUMMARY

1. — The fractional precipitation of venom solutions of *Bothrops jararaca* with ammonium sulphate permits a partial purification of the toxic activity and of the following enzymic activities of the venom: "caseinase", blood-clotting, ATP-ase, 5-nucleotidase and benzoyl-L-arginine-amidase.

2. — As regards ATP-ase and 5-nucleotidase, the active fractions are obtained between the level of saturation of 0.50 and 0.70 with ammonium sulphate but the optimal concentrations for precipitation are 0.60-0.65 for ATP-ase and 0.65-0.70 of saturation for 5-nucleotidase.

3. — The optimal concentrations for precipitation of caseinase, blood-clotting and benzoyl-L-arginine amidase are respectively 0.40-0.45, 0.60-0.65 and 0.70-0.80.

4. — The toxic activity is optimally precipitated at the level of 0.45-0.50 of saturation with ammonium sulphate.

5. — Different batches of mice proved to vary considerably as regards the sensitivity to the toxic activity of the venom of *B. jararaca* or of its fractions. In consequence, the use of mice for the quantitative estimation of toxicity of this venom or of fractions separated from it, always requires substantial expenditure of material and may be time-consuming.

RESUMO

1. — A precipitação fracionada de soluções de veneno de *Bothrops jararaca* com sulfato de amôneo permite uma purificação parcial da atividade tóxica e das seguintes atividades enzimáticas contidas no mesmo veneno: "caseinase", hemo-coagulante, ATP-ase, 5-nucleotidase e Benzoil-L-argininamidase.

2. — Obtêm-se frações com atividade ATP-ásica e 5-nucleotidásica desde o nível de saturação de sulfato de amôneo de 0,50 até 0,70; a julgar entretanto, pelas respectivas atividades à mesma base de concentração protêica, as concentrações ótimas de precipitação de ATP-ase e 5-nucleotidase são respectivamente de 0,60-0,65 e 0,65-0,70 de saturação.

3. — As concentrações ótimas de precipitação das atividades caseinásica, hemocoagulante e benzoil-L-argininamidásica são respectivamente 0,40-0,45; 0,60-0,65; e 0,70-0,80.

4. — A região ótima de precipitação da atividade tóxica fica compreendida entre os limites de saturação de 0,45 a 0,50.

5. — Nas repetições de experiências executadas para a determinação de toxidez de veneno Botrópico, ou frações dêle derivadas, verificou-se a existência de grande variabilidade entre os diversos lotes de camundongos utilizados. Em conseqüência, o uso dêstes animais para a determinação quantitativa da toxidez de veneno Botrópico ou suas frações requer sempre o dispêndio de quantidades substanciais de material e a obtenção do resultado final pode requerer grande gasto de tempo.

REFERENCES

1 — Blombäck, F. R.: and Vestermark, A. — *Arkiv. f. Kemi* 12: 173, 1958.

2 — Finney, D. J. — in Burn, J. H.; Finney, D. J.; and Goodwin, L. G. — *Biological Standardization*, London, Oxford University Press, 1950.

3 — Green, A. A.; and Hughes, W. L. — In *Methods in Enzymology*, vol. 1, p. 67 Ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. New York: Academic Press, Inc., New York, 1957.

4 — Gulland, J. M.; and Jackson, E. M. — *Biochem.* J. 32: 597, 1938.

5 — Habermann, E. — *Arch. exp. Pathol. Pharmakol.* 236: 492, 1959.

6 — Habermann, E. — *Arch. exp. Pathol. Pharmakol.* 234: 291, 1958.

7 — Hamberg, U.; and Rocha e Silva, M. — *Ciência e Cultura* 8: 176, 1956.

8 — Hamberg, U.; and Rocha e Silva, M. — *Arch. in Pharmacodyn.* 110: 222, 1957.

9 — Henriques, O. B.; Fichman, M.; and Henriques, S. B. — *Biochem. J.*, in course of publication.

10 — Henriques, O. B.; Lavras, A. A. C.; and Fichman, M. — *Ciência e Cultura* 8: 240, 1956.

11 — Henriques, O. B.; Lavras, A. A. C.; Fichman, M.; Mandelbaum, F. R.; and Henriques, S. B. *Biochem. J.*, 68: 597, 1958.

12 — Henriques, O. B.; Mandelbaum, F. R.; and Henriques, S. B. — *Nature* (Lond) 183: 114, 1959.

13 — Henriques, S. B.; Fichman, M.: and Henriques, O. B. — *Ciência e Cultura* 10: 162, 1958.

14 — Holtz, P.; and Raudonat, H. W. — *Arch. Pathol. Pharmakol.* 229: 113, 1956.

15 — Johnson, M.; Kaye, M. A.; Hems, R.; and Krebs, H. A. — *Biochem. J.* 54: 625, 1953.

16 — Kunitz, M. — *J. Gen. Physiol.*, 30: 291, 1946.

17 — Lowry, P.; Roberts, N. R.; Wu, M. L.; Hixon, W. S.; and Crawford, E. J. — *J. Biol. Chem.* 207: 19, 1954.

18 — Myers, D. K.; and Slater, E. C. *Biochem. J.*, 67: 558, 1957.

19 — Rosenfeld, G.; Hampe, O. G. and Kelen, E. M. A. — *Memórias do Inst. Butantan* (in the press).

20 — Schwert, G. W.; Neurath, H.; Kaufman, S.; and Snoke, J. E. — *J. Biol. Chem.* 172: 221, 1948.

21 — Slotta, K. — *Experientia.* 9: 81, 1953.

22 — Tompkins, E. R.; and Kirk, P. L. — *J. Biol. Chem.* 142: 477, 1942.

23 — Zeller, E. A. — *The Enzymes*, vol. I, p. 987, Ed. by Sumner, J. B. and Myrbäck, K., Academic Press Inc., New York, 1951.

STUDIES ON THE ADSORPTION OF DIPHTHERIA TOXOID BY ALUMINUM OXIDE HYDRATE GELS

P. Souza Santos*, A. Vallejo-Freire, R. S. Furlanetto e M. C. Andrade.

Instituto Butantan, São Paulo

During studies on the properties of colloidal aluminum hydroxide gels (1, 2, 3, 4, 5), we became interested in their adsorptive properties, specially of those related to the adsorption of viruses. In these studies, it is important to know the adsorptive power of the gels in aqueous media: the measurements of the amount of adsorption of dyes (6, 7) and of diphtheria toxoid (8) are the only indirect methods for evaluating the adsorptive power for viruses of aluminum hydrate gels.

From previous experiments (7) on the adsorption of diphtheria toxoid by aluminum hydroxide gels of different crystalline structures and morphologies, there was evidence that the amount of adsorption is greatly influenced by the nature of the anions present in the media. This observation is by no means new, since the effect of phosphate buffer on the elution of diphtheria toxoid adsorbed on aluminum hydroxide gel was described by Schmidt and Oerskov in 1935 (9). The same effect on other proteins and viruses has already been discussed by Sheppard in studies on the chromatographic adsorption of serum proteins and bacteriophages on silicic acid and aluminum oxide gels (10), by McLaren on the adsorption of enzymes on kaolinite (11), and by Holt (12) and Mason (13) on the adsorption of diphtheria toxoid by aluminum hydroxide and phosphate gels. However, no systematic studies are known on the influence of the nature and charge of the anions present in the medium containing the toxoid on the adsorptive power of the adsorbent. It is the aim of this paper to present the results of a study on the effect of some anions upon the adsorptive power of different aluminum oxide hydrate gels.

MATERIAL AND METHODS

Diphtheria Toxoid — Prepared according to the standard methods of the New York State Department of Health (14). The concentration of the toxoid was obtained by isoc-

* Present address: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, Brasil.

lectric precipitation with HCl at pH 3.2, separation of the precipitated toxoid by centrifugation and dissolution in the minimum amount of M/15 phosphate ($KH_2PO_4+Na_2HPO_4$) buffer of pH 7.2. This stock solution was diluted to the desired titer of toxoid, with the same phosphate buffer or with 0.85% NaCl solution. The toxoid samples for the study of the influence of anions of different valency were prepared in the same way, except that the washed toxoid was dissolved in glycine-potassium acetate buffer of pH 7.2 (7, 15). The toxoid solutions were kept in an ice box; different batches of diphtheria toxoid were used in the experiments. The titer of the toxoids was determined by the Ramon toxin and antitoxin method (16) before each experiment, the results being given in Lf units. Since M/15 phosphate buffer is used in the standard methods for preparation and dilution of the toxoid solutions (14), the same concentration of the salts of the other anions for investigating the influence of the anion was used.

Aluminum Hydroxide Gels. — The following aluminum hydroxide gels were used (7) in the adsorption experiments: 1) C-gamma gel according to Willstaetter, prepared by slow aging of C-alpha gel; the sample was aged more than two years; X-ray diffraction showed it to consist of the mixture of Gibbsite (alpha-$Al_2O_3.3H_2O$) and of Bayerite (gamma-$Al_2O_3.3H_2O$), with the predominance of the former structure, as reported in a previous paper (2); the sample contains small amounts of ammonium sulphate deriving from the preparation method. 2) Boehmite (gamma-$Al_2O_3.H_2O$) from the reaction of amalgamated aluminum with boiling conductivity water according to Fricke and Jockers; this sample consists mainly of irregular plates, as reported in a previous paper (1); it contains practically no electrolytes. 3) Bayerite from the reaction of amalgamated aluminum with conductivity water at room temperature, followed by aging of about two weeks, according to Fricke and Jockers; this sample consists of pure Bayerite, as triangular or hourglass-shaped somatoids (2). 4) Aluminum hydroxide gels of Boehmite structure prepared by reaction of aluminum chloride with sodium carbonate or ammonium hydroxide in the hot or at room temperature and purified by washing in the centrifuge or by dialysis against distilled water; Schmidt's gel was prepared from ammonium alum and ammonium hydroxide followed by washing and autoclaving at 120°C; all these samples are composed of fibrils similar to those observed in C-beta gels as described in previous papers (1, 2, 3). 5) Amorphous aluminum hydroxide gels ($Al(OH)_3$), recently precipitated (16a); the aluminum hydroxide gel was also precipitated *in situ* by reaction of aluminum chloride with ammonium or potassium hydroxide in stoichiometric amounts, at room temperature; hence, the medium contained ammonium or potassium chloride from the reaction. The properties of these aluminum hydroxide gels are described in detail in the references (1, 2, 3, 4, 5 and 16a).

The amount of aluminum contained in the gels was determined with 8-hydroxyquinolein by a volumetric method (17). For comparison of the adsorptive power, the solid content of the gels used is given as the Al_2O_3 content, in view of the different structural formulas and chemical compositions of the gels. The adsorption experiments were made by allowing the gels to be in contact with the toxoid for about one hour at room temperature, with shaking in intervals, followed by centrifugation; the titer of toxoid left in the supernatant was measured by the Ramon toxin and antitoxin method as described in a previous paper (7).

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of the Phosphate Ion. — It was first reported by Schmidt and Oerskov that phosphate ion prevents the adsorption of diphtheria toxoid (9).

Some qualitative experiments were conducted in order to study the behaviour of aluminum hydroxide gels of different crystalline structure and shape, using a fixed amount of toxoid in a medium containing M/15 phosphate buffer of pH 7.2. Typical experiments are shown in Table I.

TABLE I

INFLUENCE OF PHOSPHATE ION ON ADSORPTION OF DIPHTHERIA TOXOID BY WILLSTAETTER'S C-GAMMA GEL

Mg of Al_2O_3 contained in 20 ml of final mixture		Control	0.125	0.250	0.500	1.000	2.000	4.000	8.000
Experiment I	*Toxoid:* ml of toxoid diluted in M/15 phosphate buffer	10.0	10.0	10.	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	Diluent: ml of M/15 phosphate buffer to dilute to 20 ml								
	Number of Lf units in 20 ml of mixture	18	18	18	18	18	18	18	18
	Number of Lf units adsorbed from 20 ml	0	0	0	0	0	0	0	0
Experiment II Identical amounts of reagents as in Exp. I, with the same toxoid, but using 0.85% NaCl solution as diluent instead of M/15 phosphate buffer	Number of Lf units adsorbed from 20 ml	0	0	0	0	0	0	0	0
Experiment III Identical amounts as in Exp. II, but using toxoid diluted with 0.85% NaCl solution instead of M/15 phosphate buffer and using 0.85% NaCl solution as diluent	Number of Lf units adsorbed from 20 ml	0	0	0	0	0	0	0	0

The final volume of 20 ml in each tube was completed with 0.8% NaCl solution or with M/15 phosphate buffer of pH 7.2. A constant amount of 18 Lf units of toxoid was added to each tube. The mixture was homogenized by careful shaking, left at room temperature for one hour and centrifuged at 1560 r.p.m. for one hour. After centrifugation, the supernatant was collected and the number of Lf's titrated as described. A control was used with an identical series of tubes containing distilled water in place of the aluminum oxide hydrate gel. Titrations of the supernatants and of controls were made at the same time.

In experiment I of this table, only phosphate ion existed in the medium, with the possible exception of a small amount of sulphate ion from C-gamma gel: no adsorption occurred. In experiment II, the final volume was completed with 0.85% NaCl solution instead of phosphate buffer; the medium contained phosphate ion in a constant concentration from the toxoid and a varying amount of chloride ion: no adsorption occurred. In experiment III, the toxoid was dissolved in the smallest amount possible of phosphate buffer, but diluted with 0.85% NaCl solution in order to obtain 370 Lf units in 10 ml; in the adsorption experiment the final volume was also completed with this solution; the medium had a small constant amount of phosphate ion and an increasing concentration of chloride ion. A significant amount of adsorption of 3 Lf units was observed in the tubes containing 4 and 8 mg of Al_2O_3. These experiments confirm the fact reported (7, 9) that phosphate ion has a strong inhibiting power on the adsorption of diphtheria toxoid by Willstaetter's C-gamma gel, and show furthermore that the inhibiting power depends on the amount of phosphate present in the medium.

Similar experiments were conducted in order to investigate whether this inhibiting power is significantly influenced by the crystalline structure of the aluminum hydroxide gels (7). These experiments are summarized in Table II, and the amounts of reagents are the same as those listed in Table I.

TABLE II

COMPARISON OF THE INFLUENCE OF PHOSPHATE ION ON THE ADSORPTION OF DIPHTHERIA TOXOID BY ALUMINUM HYDROXIDE GELS OF DIFFERENT CRYSTALLINE STRUCTURE

Aluminum hydroxide gel in 20 ml of mixture	mg of Al_2O_3	0	0.125	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
Bayerite from amalgamated aluminum	Exp. I	0	0	0	0	0	0	0	0
	Exp. II	0	0	0	0	0	0	0	0
	Exp. III	0	0	0	0	0	0	0	0
C-gamma gel of Willstätter (Bayerite + + Gibbsite)	Exp. I	0	0	0	0	0	0	0	0
	Exp. II	0	0	0	0	0	0	0	0
	Exp. III	0	0	0	0	0	0	0	0
"New b" Willstätter ($AlCl_3 + {}_4OH$ + + dialysis – Bayerite + Gibbsite)	Exp. I	0	0	0	0	0	0	0	0
	Exp. III	0	0	0	0	0	3	3	3
Boehmite from amalgamated aluminum	Exp. I	0	0	0	0	0	0	0	6
	Exp. II	0	0	0	0	0	0	6	8
	Exp. III	0	0	3	3	8	18	18	18
Boehmite ($AlCl_3NH_4OH$ pp. in the boiling temperature)	Exp. I	0	0	0	0	0	0	0	0
	Exp. III	0	3	3	3	6	10	12	14
Boehmite ($AlCl_3Na_2CO_3$ pp. at room temperature)	Exp. I	0	0	0	0	0	0	0	0
	Exp. III	0	0	0	0	0	0	0	0
Boehmite ($AlCl_3 + NH_4OH$ pp. at room temperature)	Exp. I	0	0	0	0	0	3	3	3
	Exp. III	0	3	3	6	8	14	18	18

NOTE: the numbers in the table are the number of Lf units absorbed from 20 ml of suspension.

The total volume of mixture was also 20 ml; the total number of Lf units before adsorption was 18. In experiment I, the toxoid was dissolved and diluted in phosphate buffer; the final volume was completed with the same buffer. In experiment II, the toxoid was dissolved and diluted in phosphate buffer; the final volume was completed with 0.85% NaCl solution. In experiment III, the toxoid was dissolved in phosphate buffer, but diluted in 0.85% NaCl solution; the final volume was also completed with 0.85% NaCl solution. Consequently, the phosphate ion content of the medium is higher in experiment II than in experiment III. The numbers listed in the table represent the number of Lf units adsorbed by the gel from the 18 Lf units existing in the 20 ml of suspension of toxoid plus gel. The order in the table follows roughly the decreasing particle size or increasing surface area as evaluated from electron microscopy and from the adsorption of alizarin by the gels (1, 2, 3, 4, 5, 7, 16a); Bayerite gel from amalgamated aluminum has the smallest surface area.

These experiments demonstrate that phosphate ion has an inhibiting power on the adsorption of diphtheria toxoid by aluminum hydroxide gels of different crystalline structures and surface areas. This inhibiting power depends on the concentration of phosphate ion present and decreases, if the concentration of phosphate is decreased; with the exception of Boehmite gel from the reaction of amalgamated aluminum with boiling water, M/15 phosphate buffer, in the concentration and volume used, is enough to prevent adsorption of toxoid on the amounts of aluminum hydroxide gels of various crystalline structures and particle sizes listed in Table II; chloride ion does not inhibit adsorption. In the conditions used in the experiments, Boehmite gels, from amalgamated aluminum and from $AlCl_3+NH_4OH$ precipitated at room temperature, have a greater adsorptive power for toxoid than Bayerite from amalgamated aluminum. The explanation for these differences may probably be found rather in the difference of the particle size and/or surface area than in the crystalline structure (7).

Since Holt and Mason's experiments (12, 13) showed that aluminum phosphate adsorbs diphtheria toxoid and that phosphate ion also influences this adsorption, it was decided to investigate in detail the nature of this inhibiting power of phosphate ion; since its mechanism is unknown (7), the first working hypothesis which was investigated to explain this difference is that the inhibiting power is due to a difference in valency or charge of the anion and that the inhibition of the adsorption occurs by a mechanism similar to that in the coagulation of liophobic colloids by adsorption of counter ions in the diffuse double layer around the particles of the positive aluminum hydroxide gels, as discussed by Weiser (18).

Influence of the Anion Charge on the Adsorption of Toxoid. — A series of experiments was performed on the adsorption of diphtheria toxoid, using toxoid dissolved in M/15 glycine-acetate buffer of pH 7.2 (7), instead of phosphate, in order to have a monovalent anion in the medium; it was admitted that the glycine and acetate ions would behave like the ion of chloride, which had not inhibited the adsorption of toxoid, and this hypothesis was confirmed by experiments similar to that described in Table III. These results are in disagreement with Holt's (12), who found that amino acids from casein hydrolysate inhibit the adsorption of toxoid by aluminum hydroxide gel. With this toxoid solution, it was possible to investigate the influence of the charge of ions like chloride, sulphate, phosphate or citrate and ferrocyanide on the adsorption of diphtheria toxoid; potassium triphosphate was used in place of diphosphate in order to have a trivalent phosphate ion. Potassium salts were used in all experiments in view of the availability of all salts of the desired anions. A protocol of a typical adsorption experiment is summarized in Table III.

TABLE III

TYPICAL PROTOCOL OF AN ADSORPTION EXPERIMENT WITH POTASSIUM SALTS OF DIFFERENTLY CHARGED ANIONS

TUBES	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Diphtheria toxoid Nr. 55.44 in ml (400 Lf/ml)	0.250	0.383	0.588	0.902	1.385	2.125	3.250	5.000
Glycine-potassium acetate buffer of pH 7.2, in ml	4.750	4.617	4.412	4.098	3.615	1.876	1.741	—
Diluent: potassium salt solution M/15	14 ml into each tube							
Adsorbent: Bohemite from amalgamated aluminum, 20 mg Al_2O_3/ml	1 ml into each tube							
Final volume	20 ml in all tubes							
Number of Lf units per ml of final mixture	5	8	12	18	28	42	65	100
mg of Al_2O_3 per ml of final mixture	1 mg into each tube							

CONTROL: A control was made using a series of adsorption tubes identical to the one listed in this table, with the exception of the adsorbent gel, which was substituted by water. After 24 hours, all tubes, control or not, were centrifuged at 1,500 r.p.m. during 10 minutes and the supernatant transferred to another tube. Each sediment was eluted in phosphate buffer of pH 7.2 in volumes such as to complete the original volume of 20 ml.

The three series of supernatants from the controls, tests and elutions were examined as for the number of Lf units, pH and macroscopical appearance. The number of Lf units in the control was taken as the number of Lf units added; the number of Lf units left in the supernatant, or the number eluted from the sediment, was measured directly: the number of Lf units adsorbed was calculated by difference.

The results of the experiments of the adsorption of toxoid dissolved in glycine-acetate buffer and diluted with monovalent chloride, divalent sulphate, trivalent phosphate or citrate and tetravalent ferrocyanide ions on Boehmite from amalgamated aluminum, Schmidt's gel and Bayerite are summarized in Tables IV, VI and VIII. Tables V, VII and VIII summarize the pH's of the

medium in the experiments from Tables IV, VI and VIII; the pH's are practically constant in all experiments, except those with trivalent phosphate which are on the alkaline side.

TABLE IV

EFFECT OF THE CHARGE OF THE ANION ON THE ADSORPTION OF TOXOID BY BOEHMITE GEL

DILUENT	TUBE	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
M/15	number of Lf/ml before adsorption	5	8	12	18	28	45	70	100
KCl	number of Lf/ml adsorbed	5	8	12	I	11	13	10	10
solution	number of Lf/ml eluted	0	6	8	10	12	10	10	10
M/15	number of Lf/ml before adsorption	5	8	12	18	28	45	70	100
K_2SO_4	number of Lf/ml adsorbed	5	8	5	6	8	6	5	0
solution	number of Lf/ml eluted	0	0	0	0	0	0	0	0
M/15	number of Lf/ml before adsorption	5	8	12	18	28	45	65	—
$K_3C_5H_5O_4.H_2O$	number of Lf/ml adsorbed	5	8	6	3	3	—	0	—
solution	number of Lf/ml eluted	0	0	0	0	0	0	0	0
M/15	number of Lf/ml before adsorption	5	8	12	18	28	35	65	—
K_3PO_4	number of Lf/ml adsorbed	0	0	0	0	0	0	0	—
solution	number of Lf/ml eluted	0	0	0	0	0	0	0	0
M/15	number of Lf/ml before adsorption	5	8	12	18	28	35	65	100
$K_5Fe(CN)_4.3H_2O$	number of Lf/ml adsorbed	5	8	6	3	5	5	5	5
solution	number of Lf/ml eluted	0	0	0	0	0	0	0	0

Adsorbent: Boehmite gel from amalgamated aluminum in the amounts reported in Table III: 1 mg/ml (for further details see Table III).

TABLE V

PH OF THE EXPERIMENTS REPORTED IN TABLE IV

DILUENT	TUBE	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
M/15	pH before adsorption	6.8	7.0	6.9	7.0	7.78	7.1	7.0	7.0
KCl	pH after adsorption	7.2	7.2	7.1	7.2	7.2	7.3	7.0	7.0
solution	pH of the eluate	7.0	7.0	7.0	7.1	6.9	6.9	6.9	6.9
M/15	pH before adsorption	6.6	5.6	6.7	6.8	6.8	6.8	7.0	6.9
K_2SO_5	pH after adsorption	7.1	7.0	6.9	6.9	6.9	7.0	7.0	7.0
solution	pH of the eluate	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.0	7.1	7.1
M/15	pH before adsorption	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	—
$K_3C_2H_5O_4$	pH after adsorption	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	—	7.5	—
solution	pH of the eluate	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	—	7.1	—
M/15	pH before adsorption	10.5	9.7	9.5	10.5	11.0	10.7	11.0	—
K_3PO_4	pH after adsorption	9.5	9.5	9.4	9.7	10.1	10.5	10.5	—
solution	pH of the eluate	6.7	6.6	6.6	6.7	6.6	6.7	6.7	—
M/15	pH before adsorption	7.3	7.3	7.3	7.4	7.4	7.4	7.5	7.5
$K_5Fe(CN)_2$	pH after adsorption	8.1	8.1	8.1	8.0	7.9	7.9	7.9	7.5
solution	pH of the eluate	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1

TABLE VI

ADSORPTION OF TOXOID BY SCHMIDT'S ALUMINUM HYDROXIDE GEL

DILUENT	TUBE	I	II	III	IV
M/15 KC_1 solution	Lf/ml before adsorption	8	18	45	105
	Lf/ml absorbed	8	18	45	40
	Lf/ml eluted	6	15	35	30
M/15 K_2SO_4 solution	Lf/ml before adsorption	8	18	45	100
	Lf/ml adsorbed	8 8	18 18	45 42	35 35
	Lf/ml eluted	2	15	35	25
M/15 K_3PO_4 solution	Lf/ml before adsorption	8	188	45	100
	Lf/ml adsorbed	0 0	0 0	0 0	0 0
	Lf/ml eluted	0	0	0	0
M/15 $K_4Fe(CN)_6$ solution	Lf/ml before adsorption	8	18	45	100
	Lf/ml adsorbed	8	14	18	20
	Lf/ml eluted	6	12	17	17

Adsorbent: Schmidt's aluminum hydroxide gel — 1 mg/ml

TABLE VII

PH OF THE EXPERIMENTS REPORTED IN TABLE VI

DILUENT	TUBE	I	II	III	IV
M/15 KC_1 solution	pH before adsorption	6.5	6.7	6.7	6.7
	pH after adsorption	6.4	6.4	6.5	6.6
	pH of the eluate	7.4	7.4	7.4	7.4
M/15 K_2SO_4 solution	pH before adsorption	6.4	6.4	6.4	6.6
	pH after adsorption	6.8	6.7	6.7	6.8
	pH of the eluate	7.4	7.4	7.4	7.4
M/15 K_3PO_4 solution	pH before adsorption	11.3	11.3	11.3	11.3
	pH after adsorption	11.1	11.1	11.1	10.9
	pH of the eluate	7.7	7.7	7.4	7.4
M/15 $K_4Fe(CN)_6$ solution	pH before adsorption	6.9	7.4	7.2	7.7
	pH after adsorption	7.3	7.3	7.2	7.2
	pH of the eluate	7.2	7.2	7.2	7.3

TABLE VIII

ADSORPTION OF TOXOID BY BAYERITE GEL

DILUENT	TUBE	I	pH of the solution
M/15 solution	Lf/ml before adsorption	115	7.1
	Lf/ml eluted	0	7.2
M/15 K_2SO_4 solution	Lf/ml before adsorption	115	6.9
	Lf/ml after adsorption	0	7.1
	Lf/ml eluted	0	7.2
M/15 K_3PO_4 solution	Lf/ml before adsorption	115	7.5
	Lf/ml after adsorption	0	7.6
	Lf/ml eluted	0	7.2
M/15 $K_4Fe(CN)_6$ solution	Lf/ml before adsorption	110	7.7
	Lf/ml after adsorption	0	7.7
	Lf/ml eluted	0	7.2

Adsorbent: Bayerite gel — 1 mg/ml

From these tables it is evident that the adsorptive power of the gels is the same in presence of sulphate and chloride ions, but is smaller in presence of ferrocyanide or citrate and zero in presence of phosphate ion. This result, of equal amounts of adsorption of toxoid in presence of chloride and sulphate ions, is important with regard to the preparation of Schmidt's aluminum hydroxide gel for foot-and-mouth disease vaccine because, if there is a direct correlation between the aumonts of adsorption of diphtheria toxoid and foot-and-mouth disease virus (8), it is not necessary to eliminate the sulphate ion very carefully, which is a troublesome step in the preparation of this gel. From these results it can be concluded that the iufluence of phosphate ion on the adsorption is not merely due to the value of its charge or valency, since the amount of adsorption in presence of phosphate is not intermediary between chloride, sulphate, citrate and ferrocyanide and does not depend on the di or trivalency of the phosphate anion.

Hence, a second working hypothesis has to be suggested for the mechanism of the nature of the inhibiting action of phosphate ion: the action of the phosphate ion would consist in the blocking of some adsorption sites on the surface of the aluminum oxide hydrate particles, instead of a mere adsorption of the polivalent ion in the diffuse double layer, as it was first assumed. This hypothesis is in agreement with the fact shown in the experiments recorded in Table IV, that the adsorption isotherm of the toxoid in presence of chloride, sulphate, citrate and ferrocyanide ions is a chemisorption isotherm with a maximum, as found before (7). This hypothesis is also in agreement with the fact that with other aluminum hydroxide gels of different crystalline structure besides Boehmite, no adsorption occurs in presence of phosphate ion, as shown in the tables, because in all aluminum hydroxides the surface of the particles has the same nature, being only aluminum and hydrogen ions (18, 19).

From the above described experiments, no idea could be suggested as for the nature of the adsorption sites, however, in the model given by Weiser (18) of the nature of the surface of an aluminum hydroxide particle in sol or gel states, this surface is covered mainly by completely or partly dissociated aluminum ions from the dissociation of $Al(OH)_3$ or AlOOH and by some adsorbed hydrogen ions. Hence, the more probable adsorption sites would be the aluminum ions on the surface; these aluminum ions would be linked in some way to the phosphate ion, most probably by exchange of hydroxyl ions, since the pH of the medium is neutral or slightly alkaline, with formation of an insoluble compound thus blocking the aluminum ions. This assumption is reasonable, taking in consideration the following experimental facts: a) aluminum phosphate is a highly insoluble substance, whereas aluminum ferrocyanide is less soluble than phosphate; b) soluble phosphate ion is strongly adsorbed by aluminum hydroxide gels, displacing other adsorbed anions (20); c) soluble

phosphate ion reacts with solid Gibbsite and with the Kaolin minerals, giving the dihydroxy-aluminum dihydrogen-phosphate — variscite — of the formula $Al(OH)_2.H_2PO_4$ (21, 22); the formation of this insoluble aluminum phosphate is the main mechanism for fixation of phosphate ion in soils (23).

The possibility of formation of an insoluble aluminum-toxoid compound in the precipitation of toxoid by alum was also suggested by Holt (12). The suggested mechanism for the action of phosphate is not in disagreement with Holt's experiments (12), in which he found that aluminum phosphate — ($AlPO_4$) — gels adsorb appreciable amounts of toxoid, because he also observed that: a) phosphate ions inhibit the adsorption of toxoid either on aluminum hydroxide or phosphate gels; b) washed aluminum phosphate gel has a greater adsorptive power for toxoid than unwashed gel. Holt's observations would be in agreement with the mechanism suggested above, with the further assumption that there are free aluminum ions on the surface of the washed aluminum phosphate particles and that these ions are blocked in presence of phosphate ion by the formation of variscite as in aluminum hydroxide particles. From these arguments, it may also be concluded that the toxoid is probably linked to the hydroxide or phosphate gels by means of its carboxyl groups, as the hydrogen binding of carboxyl groups of polymers to hydroxyl groups of cellulose (24).

TABLE IX

EFFECT OF ANIONS ON THE ADSORPTION BY ALUMINUM HYDROXIDE GEL FROM AlC_3+NH_4OH PRECIPITATED "IN SITU"

DILUENT	TUBE	I	II	III	IV	V	VI	VII
0.85% NaCl solution	Lf/ml added	5 5	10 10	13 13	20 20	35 35	53 53	87 87
	Lf/ml adsorbed	5	10	13	20	35	53	87
glycine acetate buffer	Lf/ml added	5	8	13	25	40	65	100
	Lf/ml adsorbed	5	8	13	25	40	65	100
2.3% Na_2SO_4 solution	Lf/ml added	5 5	8 8	15 15	20 20	35 35	57 57	90 90
	Lf/ml adsorbed	5	8	15	20	35	57	90
M/15 phosphate buffer of pH 7.2	Lf/ml added	5 5	8 8	15 15	25 25	35 35	60 60	100 100
	Lf/ml adsorbed	0	0	0	3	0	5	20
Amorphous aluminum hydroxide gel — 1 mg Al_2O_2/ml								

Based on this conclusion we decided to measure the adsorptive power for toxoid of a freshly precipitated amorphous aluminum hydroxide gel (25) or an aluminum hydroxide gel precipitated "in situ" in presence of toxoid, because, due to the larger number of aluminum ions on the surface of the particles, they presumably have a greater adsorptive power for diphtheria toxoid than the crystallized hydroxides listed in Table II; it was also investigated if phosphate ion prevents the adsorption in these hydroxides.

Adsorption of Toxoid by Aluminum Hydroxides Precipitated "in situ". — Solutions of aluminum chloride and ammonium hydroxide were used as reagents of formation of the aluminum hydroxide gel; toxoid, dissolved in M/15 glycine-acetate of pH 7.2, was used in all experiments. Table IX shows the results of the preliminary experiments in presence of 0.85% sodium chloride, M/15 glycine-acetate buffer of pH 7.2, phosphate buffer of pH 7.2, and 2.34% sodium sulphate solutions as diluents.

The toxoid was distributed in increasing amounts, in a series of 8 tubes of 3.5x9 mm marked outside with a line indicating the level corresponding to 20 ml of content. In general, the distribution was made with a constant increase from 5 until 100 Lf units per ml of final mixture. The volume of each tube was raised to the volume of toxoid of the last tube by addition of glycine-potassium acetate buffer of pH 7.2. Following the last addition of reagent, the necessary amount of diluent was added to complete a final volume of 20 ml. A 10% NH_4OH and a 16% $AlCl_3 \, 6H_2O$ solution (w/v) were added in amounts corresponding to the desired number of milligrams of Al_2O_3 per ml for a final volume of 20 ml. After addition of the last reagent, the tubes were shaken by hand and then left standing at room temperature for 24 hours.

It is clearly shown in Table IX that phosphate ion inhibits completely the adsorption of diphtheria toxoid, whereas chloride, sulphate or glycine-acetate buffer do not. Furthermore, it was observed that aluminum hydroxide gel precipitated "in situ" has a very high adsorptive power, being about one thousand times greater than the other aluminum oxide gels used in former experiments (7). It was also observed that the adsorption follows a chemisorption isotherm. An experiment was performed using smaller amounts of aluminum hydroxide gel in order to verify its maximum adsorptive power for diphtheria toxoid: Table X shows the result thus obtained.

The maximum adsorptive power found was of 800 Lf units per milligram of Al_2O_3 of amorphous aluminum hydroxide gel, and the constant saturation volume (7) was about 500 Lf's per mg of Al_2O_3. These results are in agreement with Holt's observations that very small amounts of aluminum as aluminum hydroxide can precipitate large amounts of toxoid, probably in form of an insoluble aluminum-toxoid compound (12).

TABLE X

DETERMINATION OF THE MAXIMUM ADSORPTION OF TOXOID BY ALUMINUM HYDROXIDE GEL PRECIPITATED "IN SITU"

TUBE	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Lf/ml added	5	8	12	20	33	55	83	135	220	350
Lf/ml adsorbed	5	8	12	20	33	55	80	60	53	50
pH before adsorption	7.0	7.0	7.0	7.0	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.8
pH after adsorption	6.3	6.2	6.6	6.2	6.4	5.9	6.65	6.9	7.0	7.0

Amorphous aluminum hydroxide gel — 0.1 mg Al_2O_3/ml
Diluent — 0.85% NaCl to complete 20 ml of final mixture.

Experiments were conducted to verify if the ionic strength of medium containing NaCl influences the adsorption: the results are presented in Table XI. The amorphous aluminum hydroxide, however, showed in the experiments a higher adsorptive power, ranging from 980 to 1000 Lf units per mg of Al_2O_3.

TABLE XI

EFFECT OF CONCENTRATION OF NACl SOLUTION USED AS DILUENT ON THE ADSORPTION OF TOXOID BY ALUMINUM HYDROXIDE GEL PRECIPITATED "IN SITU"

TUBE	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
ml of toxoid in glycine-acetate	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
ml solution acetate-glycine	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7
10.8 ml of a solution of NaCl of the following molarity	2M	1M	M/2	M/4	M/8	M/16	M/32	0
Lf/ml added	98	98	98	95	100	100	100	98
Lf/ml adsorbed	98	98	98	95	100	100	98	98
pH before adsorption	6.8	6.9	7.0	7.0	7.1	7.1	7.1	7.2
ph after adsorption	6.0	6.0	6.1	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2

Amorphous aluminum hydroxide gel — 0.1 mg of Al_2O_3/ml

No significant variation in the adsorptive power in relation to the ionic strength was found.

Also, no significant difference was found in further experiments in the adsorptive power of hydroxide precipitated "in situ" in the pH range of 4.6 to 7.0: in these experiments, an adsorptive power of 900 Lf units per mg of Al_2O_3 as amorphous aluminum hydroxide was measured.

Influence of the Anion Charge on the Adsorptive Power of Amorphous Aluminum Hydroxide Precipitated "in situ". — Since, from the view point of amount of adsorption of toxoid, this gel showed to be the most interesting of all hydroxides used, we decided to investigate also the influence of the charge or valency of the anions present in the medium upon the adsorption of diphtheria toxoid. The following M/15 potassium salt solutions were used as the medium in which the aluminum chloride was precipitated, either by ammonium or potassium hydroxide: potassium chloride, potassium fluoride, potassium nitrate, potassium pyrophosphate and potassium citrate; the experiments were performed with both ammonium and potassium chloride, because Holt (12) found that ammonium alum is a better precipitant of toxoid than potassium alum. Toxoid dissolved in M/15 glycine-acetate buffer of pH 7.2 was used in all experiments. The amounts of reagents were the same as those used in the experiments of Table X. Table XII presents the results of the experiments on the influence of the charge of anions of different potassium salts on the adsorption of toxoid by aluminum hydroxide gel from $AlCl_3$ solutions, either by NH_4OH or KOH solutions.

These results show that the precipitate from NH_4OH has a greater adsorp-

TABLE XII

INFLUENCE OF THE CHARGE OF THE ANION OF POTASSIUM SALTS ON THE ADSORPTION OF TOXOID BY AMORPHOUS ALUMINUM HYDROXIDE GEL PRECIPITATED "IN SITU" FROM AlC_3 BY NH_4OH OR KOH

Diluent: M/15 solution of	precipitation by NH_4OH		precipitation by KOH	
	number of Lf units adsorbed by mg Al_2O_3	pH after adsorption	number of Lf units adsorbed by mg Al_2O_3	pH after adsorption
potassium chloride	greater than 870 Lf	6.3-7.0	greater than 40 Lf	4.4
potassium nitrate	greater than 950 Lf	6.2	—	—
potassium fluoride	6.5-172 Lf+50 precipitate not of $Al(OH)_3$	5.1-8.6	greater than 25 Lf – the precipitate is not $Al(OH)_3$	4.8-7.5
potassium sulphate	greater than 900 Lf	6.3-7.0	greater than 38 Lf	6.8
potassium oxalate	no precipitation of $Al(OH)_3$	6.8	—	—
potassium triphosphate	—	—	no adsorption	10.4
potassium ferricyanide	greater than 900 Lf	6.0	—	—
potassium citrate	—	—	no precipitation of $Al(OH)_3$	9.0
sodium citrate	no precipitation of $Al(OH)_3$	7.5	no precipitation of $Al(OH)_3$	—
potassium ferrocyanide	450 Lf	7.9	100 Lf	7.2
potassium pyrophosphate	no adsorption	9.3	no adsorption	
potassium sodium tartrate	no precipitation of $Al(OH)_3$	6.8	no precipitation of $Al(OH)_3$	—
sodium tetraborate	no adsorption – precipitate not $Al(OH)_3$	4.5-8.4	no adsorption – precipitate not $Al(OH)_3$	4.0-8.9

tive power than the precipitates from KOH, in agreement with Holt's findings; however, the nature of this effect is not yet understood. In most cases no precipitation of $Al(OH)_3$ was obtained, either due to complex formation or to formation of precipitates having composition different from $Al(OH)_3$. These results also confirm the previous observations that the inhibiting effect of phosphate ion on the adsorption of toxoid by aluminum hydroxide gels is not due to the charge or valency of the ion, but to a specific effect of the phosphate on the surface of the aluminum hydroxide particles.

SUMMARY

1.°) Phosphate ion has a strong inhibiting power on the adsorption of diphtheria toxoid by aluminum hydroxide gels of different crystalline structures and surface areas.

2.°) The probable mechanism of inhibition is the blocking of aluminum ions from the AlOOH or $Al(OH)_3$ molecules on the surface of the colloidal particles due to the formation of an insoluble aluminum phosphate, probably variscite — $Al(OH)_2.H_2PO_4$.

3.°) Chloride, glycine, acetate and sulphate ions do not have a noticeable inhibiting effect on the adsorption of toxoid by aluminum hydroxide gels; ferrocyanide ion has a small inhibiting power, but in smaller degree than phosphate ion. In media containing these ions, the adsorption of toxoid follows roughly a chemisorption isotherm with a maximum value for the adsorptive power. This adsorptive power of the different aluminum hydroxides is directly proportional to the surface area of the gel or inversely proportional to the average particle size; no direct relation was found between the crystalline structure and adsorptive power of the different aluminum hydroxide gels.

4.°) Adsorptive powers for toxoid ranging between 800 and 1000 Lf units per milligram of Al_2O_3 were found with amorphous aluminum hydroxide precipitated "in situ" from diphtheria toxoid dissolved in glycine-acetate buffer op pH 7.1, using aluminum chloride and ammonium hydroxide solutions as precipitants; potassium hydroxide solutions give amorphous aluminum hydroxide gels with smaller adsorptive power than precipitates from ammonium hydroxide solutions; this adsorption can be completely inhibited by phosphate ions; aluminum complexing ions such as tartrate, citrate and oxalate prevent precipitation of aluminum hydroxide and no toxoid is adsorbed.

RESUMO

1.°) O ion fosfato tem um forte poder inibidor em relação à adsorção de toxóide diftérico por géis de hidróxido de alumínio de diferentes estruturas cristalinas e áreas específicas.

2.º) O mecanismo provável dêsse poder inibidor é o bloqueio dos ions alumínio das moléculas AlOOH ou $(Al(OH)_3$ da superfície das partículas coloidais devido à formação de um fosfato de alumínio insolúvel, que é provàvelmente variscita — $Al(OH)_2H_2PO_4$.

3.º) Os ions clorêto, glicina, acetato e sulfato não apresentam um efeito inibidor apreciável na adsorção de toxóide por géis de hidróxidos de alumínio; o ions ferrocianêto tem um pequeno poder inibidor, porém em grau inferior ao do ion fosfato. Em meios contendo êsses ions, a adsorção do toxóide segue aproximadamente uma isoterma de adsorção química, com um valor máximo para o poder de adsorção. Êsse poder de adsorção é diretamente proporcional à dimensão média das partículas; não foi evidenciada nenhuma correlação direta entre o poder de adsorção e a estrutura cristalina dos diferentes géis de hidróxidos de alumínio.

4.º) Foram observados poderes de adsorção para o toxóide ocorrendo entre 800 e 1000 unidades Lf por miligrama de Al_2O_3, no caso de hidróxido de alumínio amorfo precipitado "in situ" em uma solução de toxóide diftérico dissolvido em tampão glicina, acetato de pH 7,1, sendo usados como agentes precipitantes soluções de clorêto de alumínio e de hidróxido de amônio; soluções de hidróxido de potássio produzem géis de hidróxido e alumínio amorfo tendo poder de adsorção menor do que os precipitados obtidos com soluções de hidróxido de amônio; esta adsorção pode ser completamente inibida por ions fosfato; ions complexantes do alumínio, como os ions, citrato e oxalato, impedem a precipitação do hidróxido de alumínio e nenhum toxóide é absorvido.

REFERENCES

1) Souza Santos, P., Vallejo-Freire, A. and Souza Santos, H. L. — Kolloid-Z., *133*: 101, 1953.

2) Watson, J. H. L., Parsons, J., Vallejo-Freire, A. and Souza Santos, P. — Kolloid-Z., *140*: 102, 1955.

3) Souza Santos, P. and Souza Santos, H. L. — Naturwiss., *44*: 113, 1957.

4) Watson, J. H. L., Parsons, J., Vallejo-Freire, A. and Souza Santos, P. — Kolloid-Z., *154*: 4, 1957.

5) Souza Santos, P., Watson J. H. L., Parsons, J. and Vallejo-Freire, A. — Experientia, (in press).

6) Waldmann, O., Pyl, G., Hobohom, K. O. and Möhlmann, H. — Bull. Off. Int. Epizoot., *20*: 19, 1942.

7) Souza Santos, P., Vallejo-Freire, A., Furlanetto, R. S. and Andrade, M. G. — Mem. Instituto Butantan *28*: 221, 1957-8.

8) Schmidt, S. and Fogedby, R. — Bull. Off. Int. Epizoot., *31*: 65, 1949.

9) Schmidt, S. and Oerskov, S. — Acta Path. Microb. Scand., *12*: 262, 1935.

10) Sheppard, C. C. and Tiselius, A. — Disc. Faraday Soc., 7: 275, 1949; Sheppard, C. C. and Woodend, W. G. — J. Immunol., *66*: 385, 1951.

11) McLaren, A. D. — J. Phys. Chem., *58*: 129, 1954; Soil Sci. Soc. Amer. Proceed., *18*: 170, 1954; Fed. Proc., *14*: 818, 1955; McLaren, A. D. and Estermann, E. F. — Arch. Biochem. Biophys., *61*: 158, 1954.

12) Holt, L. B. — Developments in Diphtheria Prophylaxis. pg. 64, Wm. Heinemann Medical Books, London, 1950.

13) Mason, J. H. — J. Hyg., *48*: 418, 1950.

14) Wadsworth, A. B. — Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1947.

15) Smith, T. B. — Analytical Processes, A Physico-Chemical Interpretation, pg. 443, Edward Arnold & Co., London, 1940.

16) Ramon, G. — Compt. Rend. Soc. Biol., *90*: 661, 1922.

16a) Souza Santos, P. — unpublished studies on the precipitation and aging of colloidal aluminum hydroxide.

17) Kolthoff, I. M. — Textbook of Quantitative Inorganic Analysis, pg. 638, The MacMilan Co., New York, 1947.

18) Weiser, H. B. — J. Phys. Chem., *35*: 1369, 1931.

19) Russell, A. S. — Alumina Properties, Tech. Paper n.° 10, ALCOA, 1956.

20) Mellor, J. W. — A Comprehensive Treatise on Inorganic and Theoretical Chemistry — Vol. 9, pg. 279, Longmans, Green & Co., London, 1946.

21) Kittrick, J. A. and Jackson, M. L. — Science, *120*: 508, 1954.

22) Cole, C. V. and Jackson, M. L. — Soil Sci. Soc. Amer. Proceed., *15*: 84, 1951.

23) Grim, R. E. — Clay Mineralogy, pg. 158, McGraw-Hill Book Co., New York, 1953.

24) Hofrichter, C. H. and McLaren, A. D. — Ind. Eng. Chem., *40*: 329, 1948.

25) Souza Santos, P. — unpublished studies.

Mem. Inst. Butantan,
29:213-226. 1959.

ANÁLISE DA CROTAMINA NO VENENO INDIVIDUAL DE CASCAVÉIS RECEBIDAS PELO INSTITUTO BUTANTAN (**)

S. Schenberg. *

Laboratório de Fisiologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

A constatação da existência das variedades crotamino-positiva e crotamino-negativa de *Crotalus durissus terrificus* (1, 2, 3, 4, 6) tornou necessária a verificação da concentração dessa toxina nos venenos crotálicos empregados para a preparação de sôro anticrotálico.

A crotamina sendo tóxica e só sendo secretada por certos espécimens crotálicos, pode condicionar a gravidade do acidente crotálico e sua terapêutica à variedade de cascavel comprometida no acidente. O sôro anticrotálico, por sua vez, deve ser rico em anticorpos específicos para a crotamina, uma vez que, nos acidentes por cascavéis crotamino-secretoras, a alta concentração dessa toxina requer quantidade maior de anticorpos anticrotamina, e um sôro com tais características deve ser preparado a partir de venenos contendo alta concentração dessa toxina. Êste problema é de interêsse para o Instituto Butantan, e a determinação da concentração de crotamina de seu "pool" de veneno crotálico, constitui o motivo principal do presente trabalho.

A avaliação aproximada da concentração de crotamina de um "pool" de veneno crotálico pode ser obtida, conhecendo-se a proporção de cascavéis croatmino-positivas que contribuiram para a formação do referido "pool". Êste será tanto mais rico em crotamina quanto maior fôr a percentagem de veneno proveniente da variedade crotamino-secretora. Morfològicamente ainda não é possível distinguir estas duas formas biológicas. Métodos bioquímicos e farmacológicos têm que ser empregados para a discriminação dessas duas variedades, o que constitui dificuldade para a sua diferenciação. Outro fator que se acrescenta às dificuldades do processo de discriminação destas duas formas biológicas é o hibridismo em que elas se encontram na natureza. São

---

* Bolsista do C. N. Pesq.

** Trabalho realizado com auxílio do F. P. I. B.

Desejo agradecer os auxílios técnicos prestados por Cavalheiro, D. e Mendes da Silva, U.

extensas as regiões onde se encontram as duas variedades. Neste caso, o ensaio do veneno de uma cascavel não determina a variedade a que pertençam as demais componentes do grupo, pois no mesmo poderão estar presentes espécimens das duas formas biológicas. O ensaio torna-se dispensável, quando a cascavel se origina da região crotamínica (4).

A demonstração anteriormente feita, de que a crotamina, em tôdas as extrações de uma mesma cascavel, ou sempre estará presente ou nunca será encontrada, facilita o estudo de "pools" de venenos crotálicos (4). O ensaio de uma única extração classifica uma cascavel; e o veneno de um mesmo espécimen será sempre ou crotamínico ou não crotamínico, mantendo constante a proporção com que cada variedade contribuirá para formar o "pool".

Material acumulado em trabalho anterior (4) foi utilizado para o estudo da composição do "pool" de veneno crotálico do Butantan. Procurou-se organizar, de modo sistematizado, em tabelas e mapa, os dados anteriormente colhidos, tendo-se em vista facilitar futuras investigações nos vários setores da ofiologia e do envenenamento crotálico.

O presente trabalho resulta do estudo individual do veneno de 531 cascavéis, colhidas ao acaso, em tôdas as estações do ano. Diminuiram-se assim, possíveis influências externas sôbre a secreção da peçonha. O número de serpentes utilizadas é significativo e pode-se considerá-lo como uma amostra representativa do total de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan, cujas extrações fornecem o veneno que constitui o "pool" crotálico, habitualmente empregado para fins experimentais e industriais. Considerando-se que normalmente a proporção de cascavéis enviadas ao Butantan, pelas diferentes regiões, mantem-se constante, deve-se admitir que a concentração de crotamina dêsse "pool" permanece pràticamente inalterada, por longos intervalos de tempo, uma vez que estas duas variedades crotálicas obedecem a uma distribuição geográfica.

PARTE EXPERIMENTAL

Venenos, extraídos individualmente, foram secados no vácuo, em temperatura ambiente. Para cada ensaio empregaram-se dois camundongos, que foram injetados por via subcutânea com 0.5 de veneno sêco, dissolvido em 1 ml de salina. Considerou-se como positivo o aparecimento de paralisia nas patas posteriores dos dois animais nos primeiros 30 minutos subseqüentes à injeção do veneno. O ensaio foi repetido sempre que a paralisia não se manifestava nìtidamente em um dos camundongos.

Os dados das observações foram registrados em mapa geográfico. As características do veneno individual foram assinaladas, provisòriamente, na cidade de origem da cascavel, correspondente ao local de sua captura. Poste-

riormente, a cidade foi confirmada pela verificação da residência do remetente e pela estrada de ferro pela qual fôra transportada a cascavel.

RESULTADOS

As 531 cascavéis, cujos venenos individuais foram estudados, em sua maior parte provinham dos estados de São Paulo (437), Minas Gerais (54) e Paraná (28). Também foram examinados venenos de 12 exemplares de: Mato Grosso (5), Bahia (3), Ceará (3) e Pará (1). Ùltimamente recebemos 16 cascavéis da Ilha de Marajó, o veneno das quais foi investigado em conjunto e não individualmente, razão pela qual não foram incluidas entre as demais 531. Nos ensaios do veneno dessas 16 cascavéis empregou-se a dose de 2 mg de veneno para cada camundongo, dose esta quatro vêzes superior à empregada nos ensaios habituais, mesmo assim, não foi possível obter-se ensaios positivos. Estas cascavéis possuem características morfológicas que as diferenciam das demais cascavéis encontradas no estado do Pará e parecem constituir uma nova subespécie.

Uma apreciação, em conjunto, da distribuição das cascavéis crotamino-secretoras no Brasil, parece indicar que sua freqüência é maior nos estados do Sul. Essa constatação baseia-se nos poucos exemplares examinados no presente trabalho, como também em publicação de vários pesquizadores (1, 2, 3, 4, 5, 6). Nos estados situados acima de São Paulo e a seu oeste, diminui a freqüência com que são encontradas cascavéis crotamino-positivas, sendo mesmo possível que nestes estados venha a ser delimitada uma região não-crotamínica.

Foram analisados venenos de 3 cascavéis do Ceará. O veneno de duas delas mostrou conter crotamina em apenas algumas de suas extrações. Moura Gonçalves (comunicação pessoal) demonstrou, por eletroforese em papel, a presença de crotamina em tôdas as extrações destas duas cascavéis. Aumentando a dose de veneno de 0,5 para 1 mg, Moura Gonçalves verificou que os ensaios das extrações, anteriormente negativos em camundongos, tornavam-se positivos. Êste fato parece provar que também nos estados do Norte é possível detectar-se crotamina nos venenos de suas cascavéis, mas que a concentração da toxina nêsses venenos é menor que a encontrada nos venenos do Sul. Deve-se pois relegar o conceito anterior de que o veneno crotálico do Norte brasileiro pertence ao tipo não-crotamínico.

As Tabelas I, II e III e o mapa da fig. 1, demonstram com maiores minúcias, a distribuição das variedades crotamínica, não-crotamínica e cascavéis que secretam veneno amarelo, nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná.

Em São Paulo, predominam as cascavéis de veneno branco. Apenas 3,89% das 437 cascavéis observadas secretavam veneno amarelo (círculos brancos do mapa). Quanto às cascavéis crotamínicas (círculos prêtos do mapa), é em São Paulo onde se encontra sua maior concentração, tanto que, 64,98% das 437 eram crotamino-positivas. Êste fato é de grande importância na composição do "pool" de veneno crotálico do Butantan. Considerando-se que a quase totalidade das cascavéis extraídas no Butantan provêm de São Paulo, tem-se uma explicação para a elevada concentração de crotamina nêsse "pool". Em São Paulo foi possível delimitar a região crotamínica, na qual só podem ser encontradas cascavéis crotamino-positivas. Esta região acha-se a oeste do

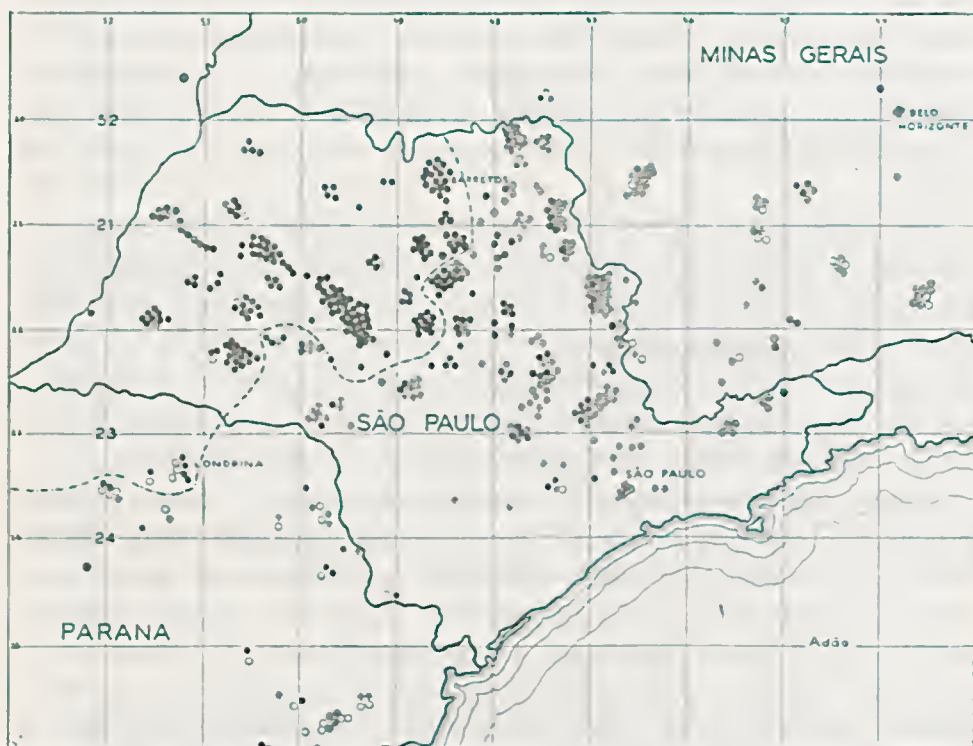



Fig. 1 — Distribuição geográfica de cascavéis Crotamino-positivas (círculos prêtos), Crotamino-negativas (círculos cruzados) e cascavéis que secretam veneno amarelo (círculos brancos) em estados do Sul.

Estado, e no mapa é delimitada por uma linha pontilhada. A distribuição dessas duas variedades crotálicas nos estados do Sul é predominantemente mista. Em uma mesma localidade podem ser encontrados os dois tipos de veneno, crotamínico e não-crotamínico, constituindo formas híbridas. Apenas

TABELA I — *CASCAVÉIS DE SÃO PAULO*

CIDADES	Cascavéis N.º	Crotamina		Côr do veneno	
		Pos.	Neg.	Branco	Amarelo
Agua Vermelha	2	1	1	2	—
* Aguapeí	4	4	—	4	—
Agudos	1	—	1	1	—
* Altair	2	2	—	2	—
Altinópolis	13	5	8	13	—
Amparo	1	—	1	1	—
* Andradina	3	3	—	3	—
* Anhangaí	2	2	—	2	—
* Araçatuba	10	10	—	10	—
Araraquara	1	1	—	1	—
Arcadas	1	—	1	1	—
* Aracanguá	1	1	—	—	1
Atibaia	2	—	2	2	—
Avaí	2	1	1	2	—
* Avanhandava	1	1	—	1	—
* Bariri	10	10	—	10	—
* Barretos	8	8	—	8	—
* Bastos União	1	1	—	1	—
Bauru	1	1	—	1	—
* Bebedouro	3	3	—	3	—
Bento Quirino	1	—	1	—	1
Bernardino de Campos	1	—	1	1	—
* Bôa Esperança do Sul	3	3	—	3	—
Bôa Sorte	2	—	2	2	—
* Bocaina	1	1	—	1	—
Bragança Paulista	2	—	2	2	—
* Bratuna	3	3	—	3	—
Brigadeiro Tobias	1	1	—	1	—
Brotas	1	—	1	1	—
Cabrália Paulista	1	—	1	1	—
* Cafelândia	3	3	—	3	—
* Cambaratiba	4	4	—	4	—
Campinas	10	7	3	10	—
Campo Limpo	1	—	1	1	—
Candiá	1	—	1	1	—
* Castilho	3	3	—	3	—
Chapadão	2	—	2	2	—
* Colina	8	8	—	8	—
Comendador Guimarães	3	—	3	3	—
* Coroados	3	3	—	3	—
Coronel Leite	5	3	2	5	—
Coronel Quito	14	3	11	11	—
Corumbataí	2	—	2	2	—
Cruzeiro	1	1	—	1	—
Domingos Vilela	2	2	—	2	—
Engenheiro Hermilo	1	—	1	1	—
Faz. Sta. Albertina	1	—	1	1	—
Faz. S. João da Colina	1	1	—	1	—
Faz. S. Joaquim	1	1	—	1	—
Fernão Dias	1	1	—	1	—
Ferraz	1	—	1	1	—

(continua)

*Cidade situada na região crotamínica.

TABELA I — *CASCAVÉIS DE SÃO PAULO* *(continuação)*

CIDADES	Cascavéis N.°	Crotamina		Côr do veneno	
		Pos.	Neg.	Branco	Amarelo
* Guaimbé	1	1	—	1	—
* Guarantã	5	5	—	5	—
* Guararapes	3	3	—	3	—
Ibaté	1	1	—	1	—
Itacaré	1	—	1	1	—
Itaiguara	1	—	1	1	—
Itapé	3	—	3	3	—
Itapira	3	2	1	3	—
* Itápolis	1	1	—	1	—
Itu	1	—	1	1	—
Ituverava	2	1	1	1	1
* Jabas	1	1	—	1	—
* Jaboticabal	6	6	—	6	—
* Jales	2	2	—	2	—
Jardinópolis	5	—	5	5	—
* Jaú	3	3	—	3	—
Java	3	2	1	3	—
* Laranja Doce	1	1	—	1	—
Laranjal Paulista	7	4	3	7	—
Lençois Paulista	3	—	3	3	—
* Lins	9	9	—	8	1
Lorena	2	—	2	2	—
Louveiras	1	—	1	1	—
* Machado de Melo	6	6	—	6	—
Maracanã	1	—	1	1	—
Marília	5	2	3	5	—
Matão	4	3	1	3	1
* Mirandópolis	3	3	—	3	—
Mococa	2	—	2	2	—
Mogi das Cruzes	1	—	1	1	—
Mogi Guaçu	1	1	—	1	—
Monjolinho	1	1	—	1	—
* Monlevade	2	2	—	2	—
* Monte Aprazível	4	4	—	4	—
* Morro Agudo	1	1	—	1	—
* Muritinga	2	2	—	2	—
* Nova Europa	3	3	—	3	—
* Novo Horizonte	3	3	—	2	1
Orlândia	1	—	1	1	—
* Osvaldo Cruz	2	2	—	2	—
Ourinhos	6	1	5	5	1
Paraíso	1	—	1	1	—
* Parapuã	1	1	—	1	—
Parnaíba	1	1	—	1	—
Passagem	1	—	1	1	—
Pederneiras	1	1	—	1	—
Pedregulho	4	—	4	4	—
Pedreira	5	—	5	3	—
Perus	1	—	1	1	—
Pinhal	2	2	—	1	1
Piracicaba	13	5	8	12	1

*Cidade situada na região crotamínica.

(*continua*)

TABELA I — *CASCAVÉIS DE SÃO PAULO* *(continuação)*

CIDADES	Cascavéis	Crotamina		Côr do veneno	
	N.º	Pos.	Neg.	Branco	Amarelo
* Pirajuí	14	14	—	14	—
Pompeia	3	2	1	3	—
Pôrto Feliz	1	—	1	1	—
* Presidente Alves	3	3	—	3	—
* Presidente Epitácio	1	1	—	1	—
* Quatá	14	14	—	14	—
* Quintana	1	1	—	1	—
* Rancharia	2	2	—	1	1
Rancho Carioca	2	1	1	1	1
Ribeira	1	—	1	—	1
Ribeirão Prêto	2	2	1	1	—
* Rinópolis	1	1	—	—	1
Rio Claro	1	1	—	1	—
Rio das Pedras	2	—	2	2	—
* Rubiácea	1	1	—	1	—
Sampaio Moreira	5	1	4	5	—
* Santa Adélia	8	8	—	8	—
Sta. Cruz do Rio Pardo	4	1	3	4	—
* San Martín	2	2	—	2	—
Santana do Parnaíba	1	1	—	1	—
* Santo Anastácio	9	9	—	9	—
S. Carlos	4	3	1	4	—
S. Joaquim	1	—	1	1	—
S. Joaquim da Barra	3	1	2	3	—
S. João da Bôa Vista	2	1	1	2	—
* S. José do Rio Prêto	1	1	—	1	—
S. José do Rio Pardo	9	2	7	9	—
S. Pedro	5	3	2	5	—
Sarapuí	1	—	1	1	—
Serra Azul	1	—	1	1	—
Sertãozinho	2	2	—	2	—
Silvânia	3	1	2	3	—
Suzano	1	—	1	1	—
* Taiúva	1	1	—	1	—
* Taquaritinga	1	1	—	1	—
Taubaté	2	—	2	—	2
Toriba	4	4	—	4	—
Trabiju	1	—	1	—	1
* Tupã	5	5	—	5	—
* Universo	2	2	—	2	—
* Urania	2	2	—	2	—
Vargem	1	—	1	—	1
Vargem Grande do Sul	10	2	8	10	—
Venerando	1	1	—	1	—
Total	437	284	153	420	17
Percentagem	—	64,98%	35,01%	96,10%	3,89%

*Cidade situada na região crotamínica.

na região crotamínica se encontra uma dessas variedades sob forma genèticamente pura. Não foi possível delimitar uma região não crotamínica nos estados examinados. Sua demonstração, baseada no estudo individual de venenos, ainda não foi descrita.

No mapa da fig 1 e na Tabela II, pode ser observado que em Minas Gerais, um dos três estados estudados com maior minúcia, predominam as cascavéis

TABELA II — *CASCAVÉIS DE MINAS GERAIS*

CIDADES	Cascavéis N.º	Crotamina		Côr do veneno	
		Pos.	Neg	Branco	Amarelo
Brasópolis	1	—	1	1	—
Campanha	1	—	1	1	—
Campo Belo	3	—	3	2	1
Carmo de Minas	2	1	1	—	2
Caxambú	2	2	—	2	—
Congo Fino	3	—	3	1	2
Conselheiro Lafaiete	1	—	1	1	—
Lima Duarte	1	—	1	—	1
Guaxima	3	1	2	3	—
Jacutinga	1	—	1	—	1
Oliveira	5	3	2	5	—
Orvalho	6	—	6	5	1
Passos	12	2	10	11	1
Pedralva	1	—	1	—	1
Pedro Leopoldo	1	1	—	1	—
Perdões	2	1	1	—	2
Poços de Caldas	1	—	1	1	—
S. Sebastião do Rio Verde	1	—	1	1	—
Três Corações	2	1	1	2	—
Uberlândia	3	—	3	2	1
Vermelho Velho	2	2	—	2	—
Total	54	14	40	41	13
Percentagem	—	25,92%	74,07%	75,92%	24,07%

crotamino-negativas (círculos cruzados do mapa): 74,07% das 54 cascavéis examinadas, pertenciam a esta variedade. Todavia, em Minas Gerais, a percentagem (25,92%) da variedade crotamino-positiva ainda é grande, e os dois tipos de veneno têm uma distribuição difusa. Pode-se encontrar cascavéis crotamino-secretoras em tôda a área daquêle Estado incluida na presente investigação.

Os espécimens analisados do Paraná (Tabela III), mostram que é no mesmo que se encontra a maior concentração de cascavéis com veneno amarelo. Das 28 cascavéis dessa proveniência, 67,85%, secretavam veneno amarelo e 50% eram crotamino-positivas. No mapa da fig. 1 é possível verificar uma área entre os estados de São Paulo e Paraná, da qual não foram examinadas cascavéis. Alguns exemplares provenientes de uma região situada logo abaixo, a noroeste do Paraná, secretavam venenos crotamínicos amarelos. Apesar da

TABELA III — *CASCAVÉIS DO PARANÁ*

CIDADES	Cascavéis	Crotamina		Côr do veneno	
	N.º	Pos.	Neg.	Branco	Amarelo
Apucarana	1	—	1	—	1
Campo Mourão	1	1	—	1	—
Curitiba	2	—	2	—	2
Euzebio de Oliveira	1	—	1	—	1
Ibaité	1	—	1	—	1
Jaguariaiva	1	—	1	1	—
João Eugênio	4	1	3	1	3
* Londrina	3	3	—	1	2
Mafra	2	1	1	—	2
Mandaguari	1	1	—	1	—
Maringá	3	2	1	—	3
Nova Restinga	1	—	1	1	—
Palmeiras	1	1	—	—	1
Ponta Grossa	1	1	—	—	1
Quatinguí	1	1	—	1	—
* Rolândia	1	1	—	—	1
Sanges	1	1	—	1	—
S. José da Boa Vista	2	—	2	1	1
Total	28	14	14	9	19
Percentagem	—	50%	50%	32,14%	67,85%

*Cidade situada na região crotamínica.

falta de continuidade, parece que a região crotamínica, partindo de São Paulo, continua-se no noroeste do Paraná, razão por que esta pequena área também se acha delimitada dentro da região crotamínica. Nesta pequena parte da região crotamínica, ao veneno crotamínico, branco, junta-se o componente amarelo. No estado do Paraná, tanto os venenos crotamínicos como os venenos amarelos, têm uma distribuição mista. As cascavéis dêsse Estado apresentam um hibridismo quadruplo. Aí são encontrados espécimens com veneno crotamínico amarelo ou branco ou também cascavéis secretando veneno não-crota-

mínico, branco e amarelo. Estas variedades podem tôdas ser encontradas em uma pequena área, convivendo hìbridamente.

Êstes dados parecem indicar não existir relação entre a secreção de crotamina e a côr amarela do veneno. Geralmente, êstes dois componentes do veneno crotálico têm distribuição geográfica independente, mas, quando uma região de veneno crotamínico branco acha-se próxima de outra de veneno amarelo pode haver superposição delas e o veneno crotamínico é, então, acrescido de mais um componente, tornando-se amarelo.

A delimitação da região crotamínica parece ser bem precisa, e dois fatos ocorridos na execução do presente trabalho servem para demonstrar a precisão de seus limites. Esta região já estava pràticamente delimitada, quando foram examinados venenos de cascavéis originárias de Silvânia e Paraíso. Alguns dêsses animais eram crotamino-negativos e, procurando-se localizar estas duas cidades no mapa que vinha sendo empregado até então, verificou-se que as mesmas situavam-se na região crotamínica. Tal localização viria invalidar a existência da região em aprêço. No trabalho rotineiro de confirmação da origem das cascavéis, verificou-se, contudo, tanto com referência à estrada de ferro pela qual elas foram transportadas como pela localização da residência dos remetentes, que estas duas cidades não poderiam se situar na região crotamínica. Procurando-se então, em mapa maior e mais minucioso do Instituto Geográfico, foi possível encontrar uma cidade (Silvânia) e uma estação de estrada de ferro (Paraíso), que correspondiam às localidades de captura das cascavéis em questão. Estas duas localidades encontram-se fora da região crotamínica, na região híbrida, justificando a dualidade dos venenos nelas encontrados. A composição do veneno permitiu, assim, constatar a existência de duas localidades homônimas no estado de São Paulo. Nas Tabelas I e III, as cidades situadas na região crotamínica foram assinaladas com um asterisco. O. Vital Brazil (5) estudou, recentemente, venenos individuais de várias proveniências; seus resultados concordam com os que aqui apresentamos. Naquele artigo, tôdas as cascavéis estudadas, provenientes da região crotamínica, pertenciam à variedade crotamino-positiva. Algumas das cidades referidas encontram-se assinaladas com um asterisco na Tabela I.

Os dados da Tabela IV fornecem as percentagens das três variedades crotálicas da amostra estudada, que em última análise representam o "pool" de veneno crotálico do Butantan.

Êstes dados mostram que o "pool" é essencialmente composto de veneno branco (90,01% das cascavéis da amostra secretavam veneno branco). Sua concentração em crotamina é elevada, pois 59,32% das cascavéis que contribuem para sua formação, são crotamino-positivas. Deve-se admitir pequenas oscilações nessa percentagem, mas a mesma deve variar entre 50 e 60%, indicando que pelo menos metade das cascavéis extraídas no Butantan secretam veneno

crotamínico. Êstes dados justificam plenamente o alto gráu de neutralização das ações crotamínicas, pelo sôro anticrotálico do Instituto Butantan.

TABELA IV — Análise do "pool" de veneno crotálico do Instituto Butantan

ESTADOS	Cascavéis N.°	Crotamina		Côr do veneno	
		Pos.	Neg.	Branco	Amarelo
São Paulo....................	437	284 *200	153	420	17
Minas Gerais..................	54	14	40	41	13
Paraná.......................	28	14 *4	14	9	19
Vários Estados...............	12	3	9	8	4
Total.........................	531	315	216	478	53
Percentagens............	—	59,32%	40,67%	90,01%	9,98%

*Total de cidades por estado situadas na região crotamínica.

Experimentalmente, o veneno do "pool" crotálico do Butantan tem suas ações crotamínicas e tóxicas neutralizadas em correspondência com a titulagem do sôro. Um veneno de "pool" de cascavéis crotamino-positivas, requer uma maior quantidade de sôro que aquela correspondente à sua titulagem, mesmo assim, obtem-se neutralização total do veneno dêsse "pool" específico, aumentando-se de pouco a quantidade de sôro que seria necessário para neutralizar o mesmo pêso de um veneno do "pool" não específico.

DISCUSSÃO

Os resultados já acumulados, constituem material abundante para substanciar a existência das variedades crotamino-positiva e negativa de *Crotalus durissus terrificus*. Outros dados que envolvem diretamente a secreção de crotamina, como também do estado em que ela é encontrada no veneno, ainda não estão bem esclarecidos.

A neutralização das ações paralisantes e tóxicas da crotamina dos venenos crotálicos pelo sôro anticrotálico, demonstra que o componente crotamínico tem propriedades imunogênicas.

Não nos foi possível, entretanto, verificar diferenças de composição entre venenos crotamínicos e não-crotamínicos, empregando-se placas de Ouchterlony. Na verdade, não utilizamos crotamina purificada nem investigamos a possibi-

lidade de se obter sôro preparado com a mesma, o que poderia dar resultados diferentes daqueles obtidos com venenos crotálicos e seu respectivo antiveneno. Mesmo assim, a não discriminação dêsses venenos pelo método de immunoprecipitação em gel apresenta argumentos para discussão.

A crotamina é fortemente básica, como demonstra seu processo de separação eletroforético. Essa característica permite supôr que no veneno ela se encontre associada ou combinada a uma proteína ácida. A proteína, sendo comum aos dois tipos de venenos crotálicos, dificultaria a diferenciação immunológica dos mesmos. Admitindo-se a hipótese da associação da crotamina com uma proteína ácida, implìcitamente também fica admitida a possibilidade de que a crotamina, imunològicamente, possa ser considerada como um hapteno. Evidentemente, ela só poderá ser considerada como tal, se, em estado altamente purificado, conservar suas propriedades farmacológicas, perdendo, entretanto, seu poder immunogênico.

A hipótese da associação crotamina-proteína faz com que se torne necessário verificar a identidade das moléculas de crotamina, obtidas por eletroforese e por cromatografia. É possível que a cisão da crotamina-proteína não se efetue na mesma ligação, nestas duas técnicas empregadas para sua separação. Se as moléculas obtidas por êstes dois processos, ainda conservarem propriedades immunogênicas, sua diferenciação poderá, possìvelmente, ser obtida pelo emprêgo de técnicas imunológicas. Neste caso, a conservação das propriedades immunogênicas implicaria no não reconhecimento da crotamina como um hapteno.

A instabilidade da crotamina purificada, quando comparada com sua estabilidade nos venenos, é mais um fator que nos leva a pensar favoràvelmente sôbre a possibilidade de sua associação com uma proteína que bem poderia ser a responsável por sua estabilidade nos venenos. É bem verdade, que proteínas purificadas freqüentemente perdem ràpidamente alguma de suas propriedades, principalmente as enzimáticas, quando não conservadas em condições especiais, junto com outras substâncias que ajudem sua não inativação. Dadas as observações feitas é possível que a associação a uma proteína, ou a presença nos venenos de uma outra substância, sejam as causas responsáveis por sua não inativação.

Concluindo, pode-se admitir, pela hipótese apresentada, que a crotamina seria encontrada no veneno sob uma forma associada de crotamina-proteína. No processo de separação, a associação crotamina-proteína seria cindida em duas moléculas, uma grande, comum aos dois tipos de venenos crotálicos, e uma menor, que ainda conservaria uma estrutura molecular capaz de provocar as ações paralisantes e tóxicas da crotamina. A molécula maior, seria a principal responsável pela resposta immunológica da qual resultam os anticorpos que neutralizam as propriedades farmacológicas da crotamina.

RESUMO

1) — Estudou-se a composição do veneno individual de 531 cascavéis.

2) — Êstes venenos foram discriminados quanto ao fato de conterem ou não crotamina e de pertencerem ao tipo amarelo ou branco.

3) — As 531 cascavéis foram consideradas como uma amostra representativa do total de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan. As cidades e estados de origem destas cascavéis, assim como as percentagens de cada variedade, foram organizadas, de modo sistematizado, em tabelas.

4) — Considerando-se os resultados do estudo da amostra, e baseado nêles, foram determinadas as percentagens com que cada variedade de cascavel contribui para formar o "pool" de veneno crotálico do Instituto Butantan. Venenos dêste "pool" são empregados na fabricação do sôro anticrotálico e dêle também são fornecidas amostras para fins experimentais.

5) — A análise dêste "pool" demonstra que êle é essencialmente constituido de cascavéis que secretam veneno branco (90,01%), e que aproximadamente metade (59,32%) das cascavéis extraídas no Butantan pertencem à variedade crotamino-secretora. Êstes dados explicam o alto poder de neutralização da crotamina pelo sôro anticrotálico fabricado no Instituto Butantan.

6) — Alguns argumentos são apresentados e discutidos, e, baseado nêles, é formulada a hipótese de que a crotamina possa ser considerada, imunològicamente, como um hapteno.

SUMMARY

1) — The individual venom composition from 531 rattlesnakes was studied.

2) — These venoms were discriminated according to the fact of containing or not crotamine or belonging to the white or to the yellow type.

3) — Those 531 rattlesnakes were considered as a representative sample of all rattlesnakes received by the Instituto Butantan. The cities and states from where these rattlesnakes were received and the percentages of each variety were organized, in a systematic form, in tables.

4) — Considering the results obtained from the sample studied, and based on them, the percentages were determined with which every rattlesnake variety contributes to form the Instituto Butantan pool of crotalic venom. From this pool venoms are employed to produce the anticrotalic serum, and samples are provided for experimental purposes.

5) — The analysis of this pool shows that it is essentially constituted by venoms proceeding from white venom secreting rattlesnakes (90,01%), and that approximately half (59,32%) of the rattlesnakes extracted in Butantan

belongs to the crotamine-secreting variety. These data justify the high crotamine neutralizing power of the anticrotalic serum produced by the Instituto Butantan.

6) — Some arguments are presented and discussed, based on which a hypothesis is proposed that assumes the possibility of crotamine being considered, immunologically, as a hapten.

BIBLIOGRAFIA

1. Gonçalves, J. M. e Vieira, L. G. — Estudos sôbre venenos de serpentes brasileiras. I — Análise Eletroforética. *Anais acad. brasil. cienc., 22*: 141, 1950.
2. Gonçalves, J. M. — Estudos sôbre venenos de serpentes brasileiras. II — *Crotalus terrificus crotaminicus*, subespécie biológica. *Anais acad. brasil. cien., 28*: 365, 1956.
3. Gonçalves, J. M. — Purification and Properties of Crotamine, em *Venoms*, ed. por Buckley, E. E. and Porges, N. (*AAASci.* Washington, D. C.) pg. 261, 1956.
4. Schenberg, S. — Geographical Pattern of Crotamine Distribution in the same Rattlesnake Subspecies. *Science, 129* (3359): 1361, 1959.
5. Oswaldo Vital Brazil — Hiperpiese provocada pela peçonha da *Crotalus terrificus terrificus*. *Anais Fac. Med. U. S. P., 29* (2): 159, 1954.
6. Barrio, A. e Vital Brazil, O. — Neuromuscular Action of the *Crotalus terrificus terrificus* (Laur.) Poisons. *Acta Physiol. Latinoamer., 1*: 291, 1951.

Mem. Inst. Butantan,
29:227-232. 1959.

*PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-RÁBICOS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A RADIAÇÕES BETA-GAMA**

W. Beçak e A. Baixeras.

As radiações ionizantes interferem no mecanismo de produção de anticorpos (8, 10). Evidenciou-se a influência das variações de tempo decorrido entre a radiação e a inoculação de antígeno (12), assim como a importância da dose de radiação (6, 11, 14) e da espécie animal (4). Várias hipóteses foram formuladas para explicar a ação das radiações: alteração dos órgãos hematopoéticos (9), do sistema macrófago-linfóide (7, 13) e interferência sôbre uma das fases do mecanismo de formação de anticorpos (3).

Não temos conhecimento de estudo referente ao efeito de radiações sôbre o mecanismo de imunização por virus. Neste trabalho preliminar apresentaremos alguns dados de provas de imunização anti-rábica de camundongos após radiação beta-gama.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: camundongos da linhagem C-Butantan (2), de 3 a 4 semanas de idade.

Irradiação: bomba de césio^{137}-bário^{137} de 48 curies, emissora de radiações beta-gama. Os animais foram divididos em três grupos; o primeiro não foi irradiado, o segundo e o terceiro, colocados em mangueiras de plástico transparente, perfuradas e dispostas em círculo ao redor da fonte, receberam 500 r e 1000 r respectivamente, num tempo total de 137 minutos.

Antígeno: vacina anti-rábica tipo Semple para uso humano, contendo 10% de tecido cerebral e preparada no Instituto Butantan.

Virus de prova: amostra CVS-56 (XIII) após 3 passagens em cérebro de camundongo. A suspensão aquosa de tecido nervoso infectado, mantida liofilizada em ampolas de 1 ml., no momento de usar foi ressuspensa em salina contendo 2% de sôro normal de cavalo e dosou em média DL_{50} $10^{-5,5}$.

Os três grupos de animais, divididos em sub-grupos, foram submetidos ao tratamento de acôrdo com a tabela I.

---

* Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas e do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan, no Laboratório de Virus e Virusterapia sob Direção do Dr. A. Vallejo-Freire.

TABELA I

Distribuição dos animais segundo a irradiação e o tratamento

Sub-grupos	Irradiação Total		Tratamento		
	500 r	1000 r	vacinação anti-rábica	inoculação virus rábico	sangria
A - 0	—	—	+	+	—
A - 500	+	—	+	+	—
A - 1000	—	+	+	+	—
B - 0	—	—	+	—	+
B - 500	+	—	+	—	+
B - 1000	—	+	+	—	+
C - 0	—	—	—	—	—
C - 500	+	—	—	—	—
C - 1000	—	+	—	—	—

Os camundongos dos sub-grupos A foram submetidos à prova de Habel (5), iniciando as vacinações 40 horas após a irradiação.

Os camundongos dos sub-grupos B foram vacinados com a mesma técnica e ao mesmo tempo. A metade dos animais foi sangrada no 18º dia e o restante no 28º. A mistura dos soros correspondentes a cada sangria foi utilizada para prova de neutralização (15) feita nas diluições de 1/2 até 1/1250, usando-se 39 DL_{50} de virus para a prova do 18º dia e 150 DL_{50} para a do 28º dia. Numa segunda experiência foram utilizados 63 DL_{50} nas provas das misturas de soros coletados no 15º e no 27º dia.

Os camundongos dos sub-grupos C serviram de contrôle sem tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da proteção da vacina nos três sub-grupos A são apresentados na tabela II.

TABELA II

1.ª Experiência. Resultados de prova de Habel nos sub-grupos A

Sub-grupos	Proteção da vacina
A - 0	> 31.600 DL_{50}
A - 500	954 DL_{50}
A - 1000	7 DL_{50}

Êsses resultados não permitem comparar os efeitos sôbre a formação de anticorpos, pois interferem nos dados de mortalidade pelo virus de prova, as mortes por efeito de irradiação.

Considerando as mortes ocorridas durante os primeiros 22 dias como independentes da ação do virus rábico, os dados foram agrupados em duas classes. Na primeira foram computadas tôdas as mortes ocorridas entre o 22º dia, isto é, 6 dias após a inoculação do virus até o 30º dia, quando a experiência foi concluída. Na segunda foram incluídos os camundongos que estavam vivos e normais no 30º dia (tabela III).

TABELA III

1.ª Experiência. Mortalidade nos sub-grupos A e C.

	A - 0	A - 500	A - 1000	C - 0	C - 500	C - 1000
mortos	4	29	21	0	3	3
sobreviventes	64	66	10	49	45	25
total	68	95	31	49	48	28

Como na mortalidade total se incluem, além do número de mortes pela infecção experimental, as mortes devidas à irradiação, foi utilizada a correção proposta por Abbot (1), comparando com os resultados nos sub-grupos C. Dêste modo, obteve-se a mortalidade devida exclusivamente às inoculações do virus (tabela IV).

TABELA IV

1.ª Experiência. Resultados corrigidos pela fórmula de Abbot*.

	A - 0	A - 500	A - 1000
mortalidade total após o 22º dia (M')	0,058	0,305	0,677
mortalidade devida ao virus de prova (M)	0,058	0,259	0,638

*M' = R + M (1 - R), onde:
M' = mortalidade total.
R = mortalidade devida a irradiação, observada nos sub-grupos C.
M = mortalidade devida ao virus de prova.

Os resultados correspondentes aos sub-grupos A, após as correções necessárias para a obtenção de M (tabela IV), foram submetidos à análise estatística, obtendo-se um valor de $\chi^2 = 30,492$ ($P < 0,01$), que é altamente significante.

Em outra experiência do mesmo tipo foram obtidos os resultados que constam nas tabelas V, VI e VII.

TABELA V

2.ª Experiência. Resultados da prova de Habel nos sub-grupos A.

Sub-grupos	Proteção da vacina
A – 0	44.600 DL_{50}
A – 500	22.400 DL_{50}
A – 1000	< 10 DL_{50}

TABELA VI

2.ª Experiência. Mortalidade nos sub-grupos A.

	A – 0	A – 500	A – 1000
mortos	6	12	24
sobreviventes	49	41	3
total	55	53	27

TABELA VII

2.ª Experiência. Resultados corrigidos pela fórmula de Abbot.

	A – 0	A – 500	A – 1000
mortalidade total após o 22.º dia (M')	0,109	0,226	0,888
mortalidade devida ao virus de prova (M)	0.109	0,153	0,874

Os resultados corrigidos desta segunda experiência (M, tabela VII), são também altamente significantes ($\chi^2 = 48,149$; $P < 0,01$).

Os soros dos animais de cada sub-grupo B, da primeira experiência, sangrados no 18º dia após a irradiação, foram misturados, para a prova de sôro neutralização, o mesmo sendo feito para a sangria do 28º dia. Os resultados obtidos, tomando-se como critério a diluição de sôro que protege 50% dos animais, são apresentados na tabela VIII.

TABELA VIII

1.ª Experiência. Resultados das provas de sôro-neutralização nos sub-grupos B.

Sangria	B – 0	B – 500	B – 1000
18.º dia	1:104	1:54	< 1:2
28.º dia	1:79	1:68	< 1:2

Na segunda experiência os animais foram sangrados no 15º e 27º dia, obtendo-se os resultados da tabela IX.

TABELA IX

2.ª Experiência. Resultados das provas de sôro-neutralização nos sub-grupos B.

Sangria	B – 0	B – 500	B – 1000
15.º dia	—	1:112	≃ 1:10
27.º dia	1:160	1:82	≃ 1:10

Os dados apresentados demonstram que, dependendo da dosagem, as radiações beta-gama deprimem ou inibem o mecanismo de formação de anticorpos anti-rábicos em camundongos estimulados repetidamente com antígeno específico, nos primeiros dias após a irradiação.

Resumo

Camundongos submetidos a radiações beta-gama (500 r e 1000 r) foram inoculados com antígeno constituído de virus rábico inativado (vacina tipo Semple) com a finalidade de determinar alterações de comportamento perante inoculação intracerebral de virus rábico (CVS).

A mortalidade dos animais inoculados está diretamente relacionada com a intensidade da irradiação; comprovou-se, por meio de provas de sôro neutralização, que êsse aumento de mortalidade corresponde a uma diminuição de formação de anticorpos nos animais irradiados e vacinados.

Summary

Mice previously exposed to beta-gama radiations (500 r and 1000 r) were inoculated with antigen consisting of inactivated rabies virus (Semple vaccine), in order to detect changes in the behaviour after intracerebral inoculation of rabies virus (CVS).

The mortality of inoculated animals is directly related with the intensity of irradiation; neutralizing tests proved that this increasing mortality corresponds to a decrease in the formation of antibodies in the irradiated and vaccinated animals.

Agradecemos ao Prof. C. Pavan por ceder a bomba de césio-bário, utilizada na irradiação dos animais.

1 — Abbott, W. S. — J. Econ. Ent., 18: 265-267, 1925.

2 — Beçak, W. — Organização de biotério de camundongos para uso experimental. Monografia Instituto Butantan, 1958.

3 — Dixon, F. J.; Talmage, D. W. and Maurer P. H. — J. Immunol., 68: 693, 1952.

4 — Gengozian, N. Makinodan, T. — J. Immunol., 80: 189, 1958.

5 — Habel, K. — Monografia 23, OMS — 1956.

6 — Hale, W. M. e Stoner, R. D. — J. Immunol., 77: 410, 1956.

7 — Jaroslow, B. N. — J. Inf. Dis., 104: 119-129, 1959.

8 — Katz, L. N. — Circulation, 5: 101, 1952.

9 — Makinodan, T.; Gengozian, N. e Congdon, C. — J. Immunol., 77: 250-256, 1954.

10 — Rodband, S.; Katz, L. N.; Bolene, C.; Pick, R.; Lowenthal, M. e Gros, G. — Circulation, 3: 867, 1951.

11 — Silverman, M. S. e Chin, P. H. — J. Immunol., 75: 321, 1955.
J. Immunol., 77: 266, 1956.

12 — [illegible]n, F. e Gump, H. P. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 85: 412-414, 1954.

14 — Taliaferro, W. H. e Taliaferro, L. G. — J. Inf. Dis., 87: 37-62, 1950.

14 — Taliaferro W. H.; Taliaferro, L. G. e Janssen, E. F. — J. Inf. Dis., 91: 105, 1952.

15 — WHO — Rabies — 100, 1956.

CHILOPODEN VON VENEZUELA (II)

von

WOLFGANG BÜCHERL

(Zoologia Médica, Instituto Butantan; C. p 65; São Paulo; Brasil)

Herr Dr. Luiz M. Carbonell, vom Zoologischen Institut der Universität in Caracas, Venezuela, hatte die Freundlichkeit, uns das Chilopodenmaterial, das von der "Sociedad de Ciencias Naturales La Salle" in zwei Expeditionen gesammelt wurde, zur Bearbeitung zuzusenden.

1. *Chilopoden von "Território Federal Amazonas"*:

Im jahre 1951 durchlief die Expedition die wenig erforschte Gegend vom Kanal Cassiquiare bis zum Quellgebiet des Orinocoflusses. Dabei konnte Dr. Luiz M. Carbonell folgendes interessante Material sammeln:

a) Von Cerro Delgado Chalbaud, einem Berge im Quellgebiet des Orinocos, von 1.120 m Höhe und mit feucht-warmen, amazonischem Klima:

Newportia bicegoi bicegoi Brölemann, 1903.

Verschiedene Exemplare.

Otostigmus inermis carbonelli, subspecies nova:

Einfarbig bräunlich, mit gelblichen Beinen und Sterniten; Kopf und erste Segmente mehr dunkel-kastanienbraun. Länge 36 mm. Kopf zerstreut punktiert, ganz ohne Furchen; vom ersten Tergit etwas am Hinterrande überdeckt. Antennen 17 gliedrig; die ersten 2 Grundglieder vollständig, das dritte nur im ersten Drittel kahl. Zahnplatten etwas breiter als lang, mit je 4 spitzen, vollständig unabhängigen Zähnen; der äussere etwas abliegend. Je eine Borste vor dem zweiten Zahne; Grundfurchen einen Winkel von 130 Grad bildend. Kieferfusshüften mit ganz kurzer schwacher Medianfurche vorne; sonst keinerlei Furchen oder Eindrücke. Tergite vom 1. bis 7. ohne Furchen; vom 8. bis 20. mit zwei vollständigen Längsfurchen; vom 10. oder 11. bis zum 21. mit deutlicher Seitenberandung. Mit flachem, medianem Längskiel vom 4. bis zum 19. Tergit (sehr schwach bis zum 10., deutlich bis zum 19. und fehlend auf dem 20.). Dornstrichelung auf dem 9. beginnend, noch schwach

bis zum 12., von da ab immer gröber und deutlicher werdend und vom 18. bis 20. längsreihig; 15. bis 20. dazu an den Seiten runzelig. Also Kopf, erste Tergite und 21. Tergit vollständig glatt, die anderen dornig, aber nicht kielstreifig. Letztes Tergit glatt, ohne Furchen und Gruben. Sternite glatt, glänzend, ganz ohne Furchen; mit grossem, sehr seichtem, etwas undeutlichem Medianeindruck und darin mit 4 flachen, auch undeutlichen Grübchen, zwei in der Mittellinie und zwei seitlichen. Letztes ohne Furchen und Gruben; hinten leicht eingekerbt. Coxopleuren nicht vorgezogen, unbewehrt. Endbeinpräfemur unbedornt. Die ersten 17 Beinpaare mit 2, die folgenden bis zum 20. inklusive mit 1, das 21. ohne Tarsalsporn.

Differentialdiagnose:

Otostigmus inermis inermis Porat 1876 hat kurze Furchem auf den Sterniten; keinen grossen Medianeindruck und keine oder nur drei Grübchen. Auf den Kieferfusshüften ist auch keine vordere Furche vorhanden.

Otostigmus tidius Chamb. 1914 und. *Otostigmus bürgeri* Att. 1903 können, obwohl sie auch 2 Sporne an den Tarsen der ersten 17 bis 18 Beinpaare aufweisen, von der neuen Unterart sehr leicht durch die glatten Tergite, ohne Dornstrichelung und ohne Medianeindrücke auf den Sterniten unterschieden werden.

Rechtfertigung der Unterart:

Schon 1950, in unseren Arbeiten "Quilópodos do Perú II" und vor allem "Quilópodos da Venezuela I", stiessen wir auf Schwierigkeiten mit der Unterbringung peruanischer und venezuelanischer Otostigmusarten. In letzterer Arbeit shrieben wir auf Seite 193, dass *O. inermis* neu untersucht werden müsse, zumal nach geographischen Zonen, da die Art von Argentinien, Kolumbien und Venezuela bekannt wurde und demzufolge sehr grossen morphologischen Variationen ausgesetzt ist, wie 2 Tarsalsporne entweder nur an 4 oder an 18 Beinpaaren; Tergite mit oder ohne weisslicher Dorsallinie; Tergite meistens vom 4. oder 5. gefurcht oder ganz ohne Furchen; Sternite ohne oder mit drei schwachen Grübchen. Wir dachten 1950 sogar daran, eventuell diese Art mit *O. pococki* in Zusammenhang zu bringen oder sie nach geographischen Zonen in Rassen aufzuteilen, wobei eine venezuelanische Rasse aufgestellt werden sollte.

Diese Rasse wird nun durch *Otostigmus inermis carbonelli* festgelegt, die dem Sammler der Expedition, Dr. Carbonell, gewidmet sein soll. *Holotyp.* Männchen, von Cerro Delgado Chalbaud, in der Sammlung des Zoologischen Institutes der Universität Caracas, Venezuela. *Paratypoide* in der Chilopodensammlung des Institutes Butantan.

Otostigmus pococki exspectus subspecies nova:

Blaugrün; Kopf und die ersten beiden Tergite kastanienbraun; Beine rosafarbig. Länge bis 80 mm. Kopf und 1. Tergit kaum punktiert. Antennen 17 gliedrig, 2 ein drittel Grundglieder kahl. Zahnplatten breiter als lang; mit 3 bis 5 kräftigen Zähnen; der äussere ist der kleinste und steht von den anderen ab. Mit tiefer rundlicher Grube und darin eine lange Borste. Grundfurchen kräftig. Kieferfusshüften mit kurzer Medianfurche vorne. Nur das 21. Tergit scharf berandet; die vorhergehenden, bis zum 10. mit aufgeworfenen wülstigen Seiten, ohne dass es zu einer eigentlichen Scheinberandung kommt. Paramedianfurchen vom 6. bis 20. Aber immer sehr zart. 6. bis 20. Tergit mit 1 Mediankiel und links und rechts davon je 1 Seitenkiel, innerhalb der Längsfurchenfläche, vom 10. bis 20. Tergite ausserhalb der Längsfurchen je 1 Seitenkiel. Vom 10. ab also 5 feinkörnig rauhe, geschärfte Längskiele, etwas schächer und irregulärer bis zum 15. Tergit, am deutlichsten vom 16. bis 20. Die Flächen neben den Seitenkielen runzelig, körnig und zum Teil kurz kielstreifig. Zwischen den 5 Längskielen sind die Flächen glatt und glänzend und nur sehr selten mit einigen Körnchen besetzt. 21. Tergit mit 3 Längskielen, nur mehr in der vorderen Hälfte; der mittlere schwächer und etwas kürzer als die seitlichen. Vor dem Hinterrande eine deutliche Grube. Sternite vom 6. bis 19. mit kurzen, aber deutlichen Längsfurchen am Vorderrande und mit drei Grübchen vorne und drei vor dem Hinterrande. Letztes Sternit länger als breit, schwach ausgerandet. Coxopleurien ohne Fortsatz. 1. Beinpaar mit 2; 2. bis 19. mit 1; 20. ohne Tarsalsporn.

Differentialdiagnose:

Otostigmus pococki pococki Krpln. 1903 hat vom 5. Tergit ab deutliche Seitenränder; keine vordere Furche an den Kieferfusshüften und keine Längsfurchen vorne an den Sterniten.

Auf die von uns in Jahre 1950 veröffentlichte Diagnose (Quilópodos da Venezuela 1, Seite 190) von 11 Exemplaren aus Rancho Grande und die wir unter *O. pococki* einreihten, obwohl ihre ersten 3 bis 4 Beinpaare 2 Tarsalstachcln besitzen, wird nun doch etwas Licht geworfen. Sowohl diese wie auch die Vertreter der neuen Unterart haben keine Seitenberandung, ausser am 21. Tergit.

Holotyp, Weibchen, von Cerro Delgado Chalband, in der Sammlung des Zoologischen Institutes der Universität von Caracas.

Paratypoide, aus Orinoco-Ugneto, in der Chilopodensammlung von Butantan.

b) Von Randal de Goajaibos:

Scolopocryptops miersii puruensis Bücherl 1941

Zwei Exemplare, die in allem mit der amazonischen Unterart vom Lago

do Mapixí, Alto Purús, übereinstimmen. Bei einem 3. beginnt die seitliche Berandung auf dem 6. Tergit und ist auf den vorderen und hinteren nur vorne deutlich.

Cormocephalus venezuelianus (Brölemann 1898).

c) Von Sabana La Esmeralda:

Cormocephalus venezuelianus (Bröl. 1898).

d) Aus der Gegend des Zusammenflusses des Orinoco und Ugueto:

Otostigmus pococki exspectus subsp. n.

e) Von Horquetas Minas:

Newportia biccgoi biccgoi Bröl. 1903

f) Von Santa Rosa de Amanadona:

Newportaria ernsti Poc. 1891.

2. *Chilopoden aus dem Staate von Zulia*, Venezuela:

Dieses von Dr. Luiz Carbonell gesammelte Material stammt aus der Gegend Ayapaima, aus 1100 m Höhe und Kunana, am Rio Negro gelegen. Infolge der Höhenlage herrscht subtropisches Klima vor, jedoch mit feuchtem amazonischem Einfluss.

a) Aus Kunana Selva (südlicher Teil):

Newportia longitarsis tropicalis subspecies nova:

Länge bis 45 mm. Ockergelb; Kopf und 1. Tergit kastanienbraun. Kopf glatt, glänzend, zerstreut punktiert, hinten mit kurzen Längsfurchen die nicht bis zur Mitte gehen. Antennen 17 gliedrig; 3 Grundglieder kahl und glänzend. Kieferfusshüften deutlich zweibogig; ohne Furchen noch Gruben. 1. Tergit mit nur wenig in der Mitte nach hinten ausgebogener Ringfurche und in der Mitte mit einer seichten Verdellung; mit zwei einfachen ungegabelten Lägsfurchen, von der Ringfurche bis zum Hinterrande. 2. — 22. Tergit mit 2 Paramedianfurchen und mit 1 flach erhabenem, jedoch deutlichem, Längskiel in der Mitte. Mit 2 Lateralfurchen vom 3. — 21. Tergit. 23. Tergit ohne Furche. Sternite 2-21 mit 1 Medianfurche; 4-21 mit 2 Lateralfurchen, die hinten abgkürzt sind. 23. Sternit ohne Furchen. 1. und 2. Tarsus vorne nur undeutlich gegliedert; hinten deutlicher, ohne Tarsalsporn. Tibien der Laufbeine nur mit Lateralsporn. Coxopleurenfortsatz lang, schlank, einspitzig. Porenarea gross, vorne den Umschlagrand erreichend.

Endbeine: — Präfemur 2 mm; Femur 1,7 mm; Tibia 1,4 mm; 1. Tarsus 0,9 mm; 2 Tarsus 2,1 mm. Präfemur mit 4 starken Dornen, davon die ersten drei in einer ventralen Reihe und der vierte, basale, mehr medial; Femur nur Borsten. Präfemur, Femur und Tibia im Querschnitte dreieckig, mit der breiten Seite oben. Oberseite apical mit Vertiefung auf den 3 Gliedern in Form einer breiten Endlängsrinne.

2. Tarsus mit 6, selten mit 7 deutlichen Gliedern, ohne Endklaue.

Differentialdiagnose:

Newportia longitarsis sylvae Chamberlin 1914 hat ebenfalls keine Grube auf der Ringfurche und die beiden Längsfurchen gehen vom Vorder-bis zum Hinterrande dieses Tergites (also auch vor der Ringfurche). Der 23. Präfemur hat medial 2 Reihen von 7-10 winzigen Dörnchen; der Femur 1-2 grosse Dornen; der 2. Tarsus der Endbeine ist 8-19 gliedrig.

Newportia longitarsis longitarsis (Newport) 1845 hat keine Mediangrube in der Mitte der Ringfurche. Ausser den beiden Längsfurchen ist eine in der Mitte abgebrochene Querfurche vorhanden. Der 23. Femur hat 1 kräftigen Dorn und der letzte Tarsus über 10 Glieder. Tergite ohne Längskiel (wie auch bei 1. *longitarsis*).

In unserer Arbeit, "Quilópodos da Venezuela 1" bezeichneten wir 4 Exemplare von El Junquito, bei Rancho Grande, Venezuela, mit dem Namen, *N. 1. longitarsis*, beschrieben aber die morphologischen Verschiedenheiten dieser. Mit Ausnahme von 1-2 Dörnchen am Femur des 23. Beinpaares stimmen diese mit *N. 1. tropicalis*, subsp. n. überein, so dass wir diese 4 Exemplare zu der neuen Unterart ziehen möchten.

Holotyp: — Weibchen, aus Kunana Selva, Venezuela; in der Sammlung des Institutes Butantan.

Paratypoide: — derselben Gegend, in den Sammlungen des Zoologischen Institutes der Universität von Caracas und im Institute Butantan.

Cormocephalus brasiliensis Humb. & Sauss. 1870

Dr. Graf Attems beschrieb 1930 das einzige Originalexemplar Saussures. Da dieses in sehr defektem Zustande war und nicht mehr alles genau erkennen liess, möchten wir eine Neubeschreibung machen:

Beschreibung von Dr. Graf Attems	Exemplare von Kunana Selva
Länge 24 mm. Antennen abgebrochen, scheinen das 1. Tergit zu überragen.	Länge 35 mm. Antennen 17 gliedrig: 5 Grundglieder oberseits unbehaart: den 2. Tergit überragend.
Furchen auf dem Kopfe nicht angegeben.	Kopf mit 2 nach vorne divergierenden und bis zur Mitte reichenden Lägsfurchen. Basalplatten gut ausgeprägt.
Kleine Basalplatten jederseits sichtbar.	
Kieferfusshüften mit 2 vollständigen Längsfurchen, die vorne in geringer	Kieferfusshüften ganz ohne Furchen noch Gruben.

Entfernung voneinander beginnen und nach hinten divergieren. 4 + 4 Hüftzähne, der laterale und mediale jeder Platte klein, weniger weit vorragend als die mittleren 2; keine Querfurche.	4 + 4 winzige Hüftzähne
1-20. Tergit mit vollständigen Längsfurchen; 21. mit Medianfurche, hinten flachbogig, nur das 21. seitlich berandet.	1-20. Tergit mit 2 vollständigen Längsfurchen; 21. mit Medianfurche. Nur dieses berandet.
Sternite der Laufbeine? 21. hinten gerade abgestutzt.	2.-20. mit 2 Längsfurchen; dazwischen 2 seichte Eindrücke; 21. mit Medianeindruck.
Coxopleuren ganz unbedornt, Porenarea den Hinterrand und die seitliche Furche erreichend.	Koxopleuren unbedornt; Porenarea den Hinterrand nicht erreichend.
Endbeine dick, Femur, Tibia und 1. Tarsus an der Basis eingeschnürt, am meisten der erste Tarsus, der unterseits rundbucklig vorgewölbt ist. Präfemur, Femur und Tibia dorsal in der Endhälfte mit breiter muldenartiger Furche. Präfemur ventral und medial unbedornt; an Stelle des Eckdorns 2 winzige Dörnchen. Klaue länger als der 2. Tarsus, ohne Sporne.	Endbeine gross, rund. Präfemur ohne Dornen, auch nicht an der Stelle des Eckdorns. Präfemur 1,4 mm, Femur 1,4 mm; Tibia 1,2 mm; 1. Tarsus 0,5 mm; 2. Tarsus 0,4 mm; Endklaue 0,8 mm; diese ohne Nebenspornen. Die Endbeine so lang wie die letzten 6 Tergite.

Habitat: — Kunana Selva, im Staate von Zulia, Venezuela.

Brasilophora sp. Bücherl, 1950 — ein Exemplar in sehr defektem Zustand, aus Kunana Selva, Nordteil, Zulia.

Newportia biccgoi biccgoi Bröl., 1903 — aus dem südlichen Teil von Kunana Selva, Zulia.

b) Aus der Gegend von Ayapaina, Zulia:

Otocryptops melanostomus (Newport), 1845

Liste der in Venezuela bisher aufgefundenen SCOLOPENDROMORPHA:

a) Verzeichnis von Graf Attems, 1930:

SCOLOPENDRIDAE — SCOLOPENDRINAE — SCOLOPENDRINI —

Scolopendra alternans; S. armata; S. gigantea; S. angulata; S. viridicornis viridicornis; S. viridis.

Cormocephalus ungulatus; C. brasiliensis.

OTOSTIGMINAE — OTOSTIGMINI —

Otostigmus inermis; O. goeldii.

Rhysida celeris; Rh. nuda immarginata; Rh. longipes longipes.

CRYPTOPIDAE — SCOLOPOCRYPTOPINAE —

Scolopocryptops miersii.

Otocryptops melanostomus.

Newportia longitarsis longitarsis; N. simoni; N. ernsti.

b) Verzeichnis von Chamberlin, 1941:

Ausser einigen von Attems schon angeführten noch folgende:

Rhysida nuda nuda; Newportia longitarsis; Otocryptops f. ferrugineus.

c) Verzeichnis von Bücherl, 1950:

Cormocephalus venezuelianus; C. brasilensis; Otostigmus inermis carbonelli subsp. n.; *Otostigmus pococki expectus* subsp. n.;

Cormocephalus impressus; Otostigmus pococki; Otocryptos melanostomus; Otocrypt. f. ferrugineus; Newportia pusilla; N. l. longitarsis.

d) In dieser Arbeit angeführte Arten:

Comocephalus venezuelianus; C. brasiliensis; Otostigmus inermis carbonelli subsp. n.; *Otostigmus pococki expectus* subsp. n.

Scolopocryptops miersii puruensis; Newportia biceyoi biceyoi; N. ernsti; N. longitarsis tropicalis subsp. n.; *Otocr. melanostomus.*

In Venezuela sind also sicher vertreten:

6	Scolopendrenarten;
4	Cormocephalusarten;
3	Otostigmusarten mit 2 Unterarten;
4	Rhysidaarten mit 3 Unterarten;
1	Scolopocryptopsart mit 2 Unterarten;
2	Otocryptopsarten mit 2 Unterarten;
5	Newportiaarten mit 3 Unterarten.

Zsammenfassung:

Das von Dr. Luiz Carbonell aus dem "Territorio Federal Amazonas" und aus dem Staate Zulia, an der kolombianischen Grenze, in Venezuela gesammelte Chilopodenmaterial wird beschrieben. *Otostigmus inermis carbonelli, Otostigmus pococki exspectus* und *Newportia longitarsis tropicalis* sind neue Unterarten. *Cormocephalus brasiliensis* wird nochmals charakterisiert.

RESUMO

É descrito o material quilopódico (*CHILOPODA, SCOLOPENDROMORPHA, SCOLOPENDRIDAE* e *CRYPTOPIDAE*), colhido por Luiz Carbonell, da Universidade de Caracas, Venezuela, no decorrer de duas expedições ao canal de Cassiquiare e às regiões das fontes do rio Orinoco e à província de Zulia, que se limita com a Colômbia.

De Cerro Delgado Chalbaud, na região do Alto Orinoco, a 1.120 m, encontram-se:

Newportia bicegoi bicegoi Bröl. 1903;

Otostigmus inermis carbonelli subsp. n.;

Otostigmus pococki exspectus subsp. n..

De Raudal de Goajaibos provieram:

Scolopocryptops miersii puruensis Bücherl 1941;

Cormocephalus venezuelianus (Bröl.) 1898.

Da região de Sabana La Esmeralda veio:

Comocephaluas venezuelianus (Bröl.) 1898.

Da confluência entre os rios Orinoco e Ugueto foi capturado:

Otostigmus pococki exspectus subsp. n.

De Horquetas Minas *Newportia bicegoi bicegoi* Bröl. 1903.

De Santa Rosa de Amanadona *Newportia ernsti* Poc. 1891.

Na província de Zulia fizeram-se capturas na "Sierra de Perijá", na fronteira com a Colômbia, perto de "Ayapaima", a 1.100 m de altura e em "Kunana", às margens do Rio Negro, com as seguintes espécies e raças:

Newportia longitarsis tropicalis subsp. n. da parte sul de Kunana Selva".

Da parte ao norte de "Kunana Selva" veio um ESCUTIGEROMORFO, que não pode ser identificado por faltarem quase tôdas as extremidades e antenas, pertencente ao gênero *Brasilophora* ou *Pselliophora*.

Da mesma região veio *Newportia b. bicegoi* Bröl. 1903.

De "Ayapaima", Zulia se capturou *Otocryptops melanostomus* (Newp.) 1845.

SUMMARY

The *CHILOPODA* (*SCOLOPENDROMORPHA*, *SCOLOPENDRIDAE* and *CRYPTOPIDAE*) collected by Dr. Luiz M. Carbonell from the "Território Federal Amazonas" and from the "State of Zulia", in Venezuela, are classified. *Otostigmus inermis carbonelli*, *O. pococki exspectus* and *Newportia longitarsis tropicalis* are described as new suospecies.

LITERATUR

Graf Attems, C. — Das Tierreich. 54. Lief. 2. Scolop., W. de Gruyter & Co., Leipzig: 1930.

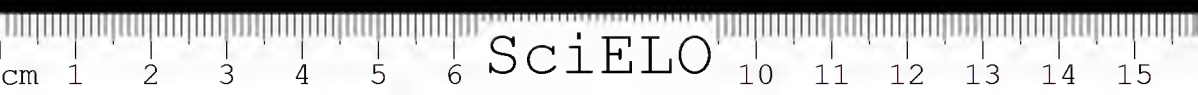
Chamberlin, R. V. — Proc. Biol. Soc. Washington, 54: 137-142; 1941.

Verhoeff, K. W. — Beiträge zur Fauna Perus 1: 60-68; 1942.

Bücherl, W. — Mem. Inst. Butantan, 22: 187-198; 1950.

WIDMUNG

Wir möchten diese kleine Arbeit dem unerschrockenen Forscher *ALEXANDER von HUMBOLDT*, dessen hundert-jähriger Todestag in diesem Jahre gefeiert wird, und der so manche dieser unwirtlichen Gegenden, die hier aufgezählt werden, begangen haben mag, widmen.

(Zum Verlegen eingereicht am 12. Februar 1959)

ESCORPIÕES E ESCORPIONISMO NO BRASIL

IX. Combate ao escorpião, *Tityus serrulatus* (*BUTHIDAE, TITYINAE*), nos terrenos da General Motors do Brasil, em São José dos Campos, Estado de São Paulo.

WOLFGANG BÜCHERL

(Trabalho do Laboratório da Zoologia Médica, Instituto Butantan; C. p. 65)

INTRODUÇÃO

Em trabalhos anteriores temos verificado, que o escorpião amarelo, *Tityus serrulatus*, da família *BUTHIDAE*, subfamília *TITYINAE*, é um dos mais venenosos do mundo. Repetidas aferições do poder tóxico de seu veneno em várias dezenas de lotes de camundongos têm demonstrado que a dose de veneno natural, obtido dos escorpiões vivos por percussão elétrica e dessecado em vácuo, 50% mortal para êstes animais de laboratório, oscilava entre 0,3 e 0,5 gamas por via subcutânea e por g de animal.

Por outro lado conseguimos estabelecer em elevado número de escorpiões da mesma espécie, que a quantidade média de veneno sêco de cada espécimen oscilava entre 0,30 e 0,50 mg e a quantidade máxima entre 0,8 e 1,0 mg.

Finalmente eruimos das estatísticas de acidentes humanos havidos com esta espécie, feitas tanto em Ribeirão Prêto pelo médico chefe do Pronto Socorro local como em Belo Horizonte, por Octávio de Magalhães, que a percentagem de mortes humanas, oscilava, quando não houve socorro imediato pela sôroterapia específica, entre 0,8 e 1,5% para adultos em Ribeirão Prêto e 2 a 4% em Belo Horizonte e entre 8 a 12% para crianças recem nascidas.

Deixando de lado a complicada questão, se o veneno escorpiônico possui de fato substâncias tóxicas ao homem ou se é a dôr veemente a causa direta ou indireta da morte, fica-se contudo impressionado perante a periculosidade dêste aracnídeo.

Foi nos possível, por outro lado, estabelecer certos hábitos de vida e a distribuição geográfica desta espécie. Estabelecemos, em base de nossas observações, que *Tityus serrulatus* era essencialmente de "hábitos domiciliares", isto

é, que, tôda vêz que se lhe oferecia oportunidade para isto, abandonava voluntàriamente seus esconderijos naturais no solo e se mudava para a residência humana, onde, sabendo ser "omnipresente e ausente ao mesmo tempo", conseguia multiplicar-se enormemente antes que o homem ficasse alarmado com sua presença.

As estatísticas, por nós elaboradas, quando tomamos parte, como "penetra" aliás, nas campanhas de eradicação desta espécie das cidades de Belo Horizonte e de Ribeirão Prêto, empreendidas pelo Serviço da Malaria, mostram, claramente, como êste aracnídeo foi capaz de, em anos sucessivos e sem despertar muito o "clamor público", tomar conta, aos poucos, de uma cidade inteira.

Os nossos dados sôbre a distribuição geográfica são significativos também neste sentido. Recebemos, por fornecedores do Instituto Butantan, ou caçamos nós mesmos em repetidas excursões, esta espécie nas seguintes cidades:

Estado de São Paulo: Barretos, Jaboticabal, Sertãosinho, Ribeirão Prêto, Socorro, Amparo no nordeste do Estado e de Cachoeira, Lorena, Guaratinguetá, Aparecida e Pindamonhangaba no vale do Paraíba, ao longo da estrada de ferro que liga a Capital paulista com Rio de Janeiro.

Deixou-nos inquieto o aparecimento, ainda que esporádico felizmente, de alguns exemplares em Osasco e Santo André, nas imediações de São Paulo, onde esta espécie não existe ainda. Investigando nestes locais, verificamos que se tratava ou de serrarias ou de estabelecimentos que vendiam plantas e xarxim, trazendo os escorpiões com seus materiais.

Estado de Minas Gerais: Belo Horizonte (hoje com poucos), Passagem, Mariana, Nova Era (muitíssimos), Juiz de Fora, São João del Rei, Diamantina, Corvelo, Montes Claros, Monlevade (muitíssimos), Pitangoi, Paraopeba, etc..

Estado de Goiás: Anapolis, Catalão, Ipameri, Santa Cruz.

Em muitas destas cidades mencionadas houve mortes humanas a lamentar, principalmente de crianças, como se pode deduzir dos índices de toxicidade da peçonha e da quantidade da mesma, inoculada nas picadas.

Nós mesmos, numa viagem de investigação pelo vale do Paraíba, desde Queluz até Pindamonhangaba, com paradas em tôdas as cidades mencionadas, verificamos, em casas velhas, em pedreiras, em rachaduras dos barrancos, nas madeiras empilhadas e principalmente em serrarias e olarias a existência do *Tityus serrulatus*. Sua freqüência numérica aumentava ou diminuia na medida que se tratava de uma cidade antiga ou nova. Em Volta Redonda, por exemplo, e em Caçapava, onde existem ruas largas, limpas e bem calçadas e moradias novas, cuidadosamente rebocadas, não existia o escorpião. Em Apare-

cida ao contrário, com seus casarões antigos, suas ladeiras cheias de fendas e com muros de arrimo construídos com pedras sobrepostas, sem ligação por cimento e com vastas fendas, é o mesmo bastante freqüente.

Todos êstes fatores — a periculosidade do aracnídeo, a relativa facilidade de sua dispersão passiva para outras cidades, inclusive talvez São Paulo, seus hábitos domiciliares nos mantinham de sobreaviso. Como substâncias escorpionicidas recomendamos à população oRhodiatox, o DDT ou BHC, em aspersão com pulverisador ou sob a forma de pó, para ser espalhado sob os móveis dentro dos cômodos das residências, ao longo das paredes.

Uma feliz coincidência, embora dolorosa para o acidentado, chamou a nossa atenção sôbre o vasto terreno, que a General Motors do Brasil, S.A., acabava de adquirir para aí instalar suas fábricas de automóveis. Um dos operários, que erguiam então os primeiros bangalôs de madeira, fora picado por um escorpião. O causador do acidente foi nos trazido ao Butantan. Era um *Tityus bahiensis*.

Fomos a São José dos Campos e inspecionamos demoradamente as construções já feitas, as que estavam por fazer, os montões de madeira empilhados, etc.. Qual não foi a nossa surprêsa, quando viamos várias dezenas de exemplares vivos de *Tityus serrulatus!*

Após algumas horas de inspeção sumária em diversos locais daquele extenso terreno, firmou-se em nós a convicção de que os escorpiões deviam ter sido trazidos com o material, particularmente com as madeiras e que êles estavam justamente no ponto de "nidificarem" nas dependências de madeira já construídas.

Envidamos a seguir todos os esforços para exterminar êste foco incipiente, tanto mais perigoso quanto se tratava de um local "às portas de São Paulo" e onde seriam construídas, mais tarde, casas de moradia para as famílias dos operários daquela firma.

Investigações em campo

Autorizados pela Diretoria do Instituto Butantan, empreendemos nas semanas seguintes várias dezenas de visitas ao local, à esquerda da Via Dutra, nas imediações da cidade de São José dos Campos.

Nos arredores desta cidade, principalmente nos vãos sob os cupins, particularmente abundantes em certas "ilhotas" mais elevadas e mais secas, com chão arenoso, e mesmo dentro dos quintais de algumas casas menos cuidadas, encontramos com relativa freqüência uma outra espécie do mesmo gênero, o *Tityus bahiensis*, cuja picada e inoculação de peçonha, se bem que muito dolorosa também, costuma acarretar no homem conseqüências muito menos graves.

Procedendo à pesquizas em tôda a volta dos terrenos da General Motors, em nenhum lugar encontramos o *Tityus serrulatus*. No terreno pròpriamente dito, porém, onde estavam procedendo a extensas terraplanagens e excavações, que iriam receber os fundamentos de futuros edifícios, encontramos alguns escorpiões. (fotografia 1). Mais numerosos foram os encontrados nos montões de madeira (fotografias 2) e mesmo sob as pilhas de madeiras e táboas (fotografia 3).

Foto 1: Aspecto dos terrenos aplainados da General Motors do Brasil, em São José dos Campos.

Finalmente extendemos as inquirições aos próprios bangalôs de madeira — aliás construídos com muito gôsto, embora não condizentes com a periculosidade do local. Funcionavam aí o almoxarifado, o depósito de ferramentas e de matéria prima, diversos escritórios para engenheiros, uma enfermaria, uma serralheria, uma carpintaria, vestuários, uma sala de reunião, etc.. (fotografia 4). Algumas dezenas de exemplares de *T. serrulatus* foram encontrados aí e levados ao Butantan.

Em torno de cada casa improvisada havia uma faixa de pedra britada de cêrca de 1 metro e meio de largura. Em seguida, em direção à casa, vinha

uma estreita faixa cimentada. Mais para dentro ainda, já encostada aos próprios fundamentos do bangalô, existia uma faixa de grama. Em seguida vinha a parede externa da casa, feita, de taboas pregadas umas sôbre as outras, em sentido horizontal quanto às primeiras 5 inferiores. Depois vinham as janelas, continuadas em tôda a sua altura por tábuas verticais. Por cima, finalmente, seguiam-se novamente táboas horizontais, sôbre as quais repousavam telhas onduladas de cimento amianto.

Os engenheiros não podiam adivinhar de antemão que, com esta disposição, feita com muito capricho, — pedras, cimento, grama e a casa de madeira com tábuas pregadas uma sôbre a outra, — êles ofereciam a êste temível escorpião uma "residência" fàcilmente penetrável (fotografia 5), onde êle se poderia esconder à vontade e proliferar o quanto quisesse.

Principalmente na casa do almoxarifado já não era possível pensar-se em esvasia-la tôda, tal a quantidade de material acumulado.

Perto dalí havia um declive, prosseguindo o caminho para a baixada ao oeste. Por alí havia as oficinas e outras construções de madeira, de onde retiramos igualmente um bom número de *T. serrulatus*.

Foto 2: Encontramos *Tityus serrulatus* escondido sob os montões de restos de madeira, espalhados pelo campo.

Medidas de combate

Os engenheiros e altos funcionários da emprêsa convocaram os mestres e contra-mestres e alguns dos operários mais esclarecidos. Com êstes palestramos demoradamente, desenvolvendo-lhes o nosso plano de ação para exterminar o foco do escorpião. Mostramos-lhes os esconderijos prediletos dêste aracnídeo, os vãos entre as tábuas, ao longo do chão, a zona de contato entre a faixa de grama e a madeira da tábua inferior das casas. Dispuzemos

Foto 3: As madeiras empilhadas constituiam esconderijos prediletos de *Tityus serrulatus.*

"armadilhas" à entrada de cada construção sob a forma de um saco de aniagem, prèviamente humedecido e extendido no chão. Em cada dia seguinte, logo de manhã, deveria o lado inferior do saco ser examinado cuidadosamente, recolhendo-se os escorpiões por ventura achados. Ao retirarem as pilhas de tábuas, principalmente quando chegassem às camadas inferiores, deveriam espiar antes nos lugares, onde depois seguravam com as mãos. Caso houvesse novos acidentes, deveriam imediatamente encaminhar-se à enfermaria.

Ao enfermeiro instruimos exatamente, como, onde e em que quantidades deveria injetar o SÔRO ANTIESCORPIÔNICO, feito pelo Instituto Butantan e por nós depositado em estoque razoável na própria enfermaria.

Tivemos, finalmente, uma palestra demorada com os técnicos superiores da emprêsa — uma espécie de "mesa redonda", com perguntas e respostas, vindas de todos os lados, em inglês, em português, em alemão.

Era importante realmente que se extirpasse o foco, sem causar grande alarma entre as centenas de operários. Em São José dos Campos conseguimos comprar um aspersor manual. Compramos algumas dezenas de quilos de B H C, mais tarde de D D T e R H O D I A T H O X. Colocaram à

Foto: 4: Os bungalows, que serviam de escritórios, de almoxarifado e de oficinas, construídos de madeira, com telhados de brasilite, foram cuidadosamente e repetidas vêzes desinfectados com os inseticidas.

nossa disposição um homem que, dalí por diante, só tinha que fazer um serviço: espargir, segundo as nossas instruções, tôdas as construções, na altura de um metro do chão, pelo lado interno, bem como as pilhas de madeiramento e o material acumulado no almoxarifado, indo de casa em casa, da primeira à última. Em todo êste serviço êle gastava 3 a 4 dias, repetindo sempre todo o serviço com uma semana de intervalo.

Mostramos a êle, como se preparavam as soluções a 10% dos respectivos inseticidas; como funcionava a bomba e as precauções que êle mesmo deveria tomar, para não vir a sofrer possíveis intoxicações.

Nas semanas seguintes voltamos por diversas vêzes ao mesmo local para vermos a execução e os resultados destas medidas. Tudo corria realmente satisfatòriamente. No começo ainda apareciam *Tityus serrulatus*, aparentemente até em número maior que antes. Na realidade, porém, êles se sentiam acossados em seus esconderijos e preferiam uma fuga aberta, podendo ser mortos ou capturados.

Foto 5: Os bangalôs estavam circundados por uma faixa larga de pedra britada, seguida por estreita faixa cimentada, crescendo grama sob os fundamentos da construção.

Com o correr do tempo e na medida que os primeiros alicerces das futuras fábricas cresciam do solo, uns após outros, e o imenso terreno começava a tomar outras feições, com estradas internas, canalisação de águas pluviaís, cimentação de extensas áreas, linhas de montagens a surgir, diminuiam os escorpiões.

Em nossos recipientes, colocados em cada prédio, em breve tempo, já não havia um só aracnídeo.

Êste estado de coisas continuava mês após mês, durante o inverno e o verão seguinte. Nem mesmo na época do acasalamento, quando êles costumam vir à luz do dia, podendo ser vistos e apreendidos mais fàcilmente, puderam ser encontrados.

Passou-se agora mais de um ano. As fábricas estão praticamente terminadas, os primeiros bangalôs desapareceram novamente e tudo parece estar normalizado em São José dos Campos, nos terrenos da General Motors do Brasil.

Contudo, baseados já em alguma experiência e desconfiados da eficácia dêstes inseticidas, pois em ensaios no nosso laboratório temos visto que aos poucos se faz notar uma resistência cada vez mais tenáz a êste, continuamos a aconselhar cuidadosa vigilância, ali, já que as condições do terreno se tem mostrado propícias ao *Tityus serrulatus*.

Conclusão e Sumário

O êxito, obtido pela aspersão freqüente de tôdas as áreas, em que o *Tityus serrulatus* se podia refugiar, com inseticidas de contato, em solução a 10% — permite deduzir os seguintes fatos:

a) Quando esta aspersão é feita com todo o cuidado e em tôdas as áreas ao mesmo tempo, não deixando-se escapar nem um só local, é perfeitamente possível reduzir-se a quantidade de escorpíões a um mínimo tolerável ou mesmo exterminá-los.

b) Para que haja garantia de êxito, entretanto, é necessário que os escorpiões sejam, de fato, atingidos diretamente pelas aspersões com o inseticida — o que foi conseguido perfeitamente nas primeiras construções da General Motors em São José dos Campos, pois as mesmas consistiam em bangalôs de construção muito simples, sem porões ou vãos entre as paredes e sem fôrro por baixo dos telhados.

c) Não se deve interromper a aspersão cedo demais, isto é, tôdas as áreas suspeitas devem ser repassadas pelo menos 3 vêzes em cada mês, continuando-se a operação durante cêrca de 3 meses.

Zusammenfassung

Auf den Terrains der Autofabriken der General Motors do Brasil S.A., in São José dos Campos im Staate von São Paulo, wurden gleich zu Beginn der Bauarbeiten, neben dem weniger gefährlichen Skorpion, *Tityus bahiensis*, auch der sehr gefürchtete gelbe Skorpion, *Tityus serrulatus*, gesichtet.

Da es sich bei dieser Art um die giftigste Brasiliens handelt, mit einer mittleren, 50% — igen tödlichen Mänsedosis von nur 0,3 bis 0,5 Gama por Gramm Maus, subcutan und da die mittlere, durch elektrische Perkussion, gewonnene Trockengiftmenge durchschnittlich 0,30 bis 0,50 Milligramm, mit Höchsttrockengiftwerten von 0,8 bis zu 1 Milligramm pro Skorpion, beträgt und da statistich nachgewiesener Weise allüberall, wo dieser Skorpion in grösseren Mengen auftritt, auch menschliche Todesfälle im Verhältnis von etwa 0,8 bis zu 4% bei Erwachsenen und bis zu 8-12% bei Kleinkindern vorkommen, war es für uns eine abgemachte Tatsache, dem *Tityus serrulatus* unverzüglich auf den Leib zu rücken. Schon im Januar 1959 hatten wir den Beweis erbringen können, dass im Laboratoriumsversuch diese Skorpione mit einem Kontaktinsektizid der Gruppen — RHODIATOX (Dyaethyl — Para-nitrophaenyl — Thiophosphat) — D D T (Dychlor — Dyphaenyl — Trichloraethan) und Gammexane oder B.H.C. bei genügend lange andauernder Behandlung ausgerottet werden können.

Auf Ansuchen von Dr. Bayerlein, einem hohen Angestellten der General Motors, studierten wir die Situation "in loco". Dabei konnten wir einwandfrei feststellen, dass dieser Skorpion nicht schon vorher auf den Terrains vorhanden war, wie der *Tityus bahiensis*, sondern dass er vielmehr, hauptsächlich mit dem Bauholze und mit den vielen Ziegeln, von Norden nach hierher verschleppt worden war und sich nun schon in die aus Holz gebauten Bungalows, Schuppen und Werkstätten eingenistet hatte.

Da diese Bauten sehr sorgfältig ausgeführt worden waren und aus übereinanter genagelten Brettern bestanden, war an sich den etwa versteckten Skorpionen relativ leicht beizukommen.

Wir besprachen die Situation vorerst mit den höchsten Ingenieuren und anderen wichtigen Angestellten; dann versorgten wir die gut eingerichtete "Enfermarie" mit Anti-Skorpion-Serum. Schliesslich wandten wir uns an die verantwortlichen Vorarbeiter und vereinbarten mit ihnen, wie wir die Skorpione vernichten könnten und welche Massnahmen zur Unfallverhütung ergriffen werden müssten. In allen Blockhäusern und Arbeitsschuppen wurde ein feuchter Sack zu Boden gelegt und seine Unterseite jeden Morgen sorgfälting auf etwa vorhandene Skorpione untersucht. Diese wurden lebendig gesammelt und nach Butantan gesandt.

Schliesslich stellte man uns einen Arbeiter zur Verfügung. Mit diesem kauften wir die Insektizide und eine manuell zu bedienende Spritzpumpe, die das Insektizid vaporisierte. Damit wurden-unter den nötigen Vorsichtsmassregeln alle Bungalows, Werkstätten, sowie das im Freien aufgestappelte Bauholz regelmässig bespritzt. Eine Desinfizierung aller Gebäulichkeiten dauerte ungefähr drei Tage. Dieselbe wurde in Abständen von je einer Woche sorgfältig wiederholt.

Wir selber überzeugten uns von der Wirksamkeit dieser Massnahmen, indem wir sowohl diese Arbeiten kontrollierten, wie auch vor allem die ganze Umgebung der Terrains absuchten. In etwa 20 Reisen nach São José dos Campos, sowohl in die verschiedenen Stadtbezirke, wie auch an die Peripherie derselben und vor allem in die Umgebung der zukünftigen Autofabriken, suchten wir vergeblich nach *Tityus serrulatus*. Nach etwa 3 Monaten wurde er auch auf den Terrains der General Motors immer seltener und kurze Zeit hernach konnten wir annehmen, dass er entweder schon ausgerottet oder nur mehr in so einer geringen Anzahl vorhanden sei, dass er keine ernste Gefahr mehr bedeuten würde.

Entregue para publicação, em 24-8-59

ESCORPIÕES E ESCORPIONISMO NO BRASIL

X. CATÁLOGO DA COLEÇÃO ESCORPIÔNICA DO INSTITUTO BUTANTAN.

por

WOLFGANG BÜCHERL

Trabalho do Laboratório de Zoologia Médica, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

INTRODUÇÃO

A COLEÇÃO dos ESCORPIÕES do INSTITUTO BUTANTAN abrange não sòmente elevado número de exemplares mas também grande variedade de gêneros e espécies. É, sem dúvida, uma das maiores de todos os centros de estudos da América do Sul e Central e seu manuseio possibilita a qualquer interessado uma perfeita especialização no tocante à morfologia das espécies sul-americanas e quiçá da maioria das demais espécies de outros continentes.

À quantidade de exemplares coletados, conservados em perfeito estado e catalogados, ajuntam-se ainda várias centenas e milhares de espécimens, recebidos anualmente pelo Instituto Butantan por seus fornecedores e colaboradores do campo e conservados vivos em grande parte para investigações biológicas de alimentação, reprodução, crescimento, duração de vida, extração periódica de venenos por eletro-choque e sua titulação, etc..

Algumas cifras ilustram perfeitamente a amplitude da Coleção *escorpiônica* do Instituto Butantan:

Segundo o magistral catálogo de escorpiões, publicado por Kraepelin (1) em 1899, existem no mundo 283 espécies,
56 gêneros,
10 subfamílias e
6 famílias.

C. de Melo-Leitão (2), em sua monografia sôbre escorpiões sul-americanos, incluindo, além do Brasil, a Argentina, Chile, Uruguai, Paraguai, Bolívia, Perú, Equador, Colômbia, Venezuela e as três Guianas aferiu em 1945:

Realizado sob os auspícios do Fundo de Pesquisa do Instituto Butantan.

207 espécies,
26 gêneros,
5 subfamílias e
6 famílias.

Pois bem, a atual coleção do Instituto Butantan, que está sendo ampliada continuamente, abrange nada menos de:

125 espécies,
38 gêneros,
10 subfamílias e
6 famílias.

O número total de exemplares conservados e catalogados eleva-se a 1.862. Os demais exemplares, com o respeitável número de 60.277, recebidos pelo Instituto Butantan desde 1949, foram, depois de aproveitados para as finalidades do Instituto, quase totalmente doados a ginásios, colégios e outros estabelecimentos de ensino, como contribuição do Instituto Butantan à formação de pequenos museus escolares.

A esta quantidade, por sí já assombrosa, devem ser acrescidos mais 91.355 telsa de escorpiões, coletados desde 1949 e empregados então como materia prima da fabricação de sôros.

Somando-se êstes totais — os exemplares da Coleção, os escorpiões entrados vivos, os aproveitados para a coleta das glândulas de veneno — verificamos que passaram por êste laboratório, no último decênio, nada menos de 160.494 escorpiões.

A Coleção escorpiônica foi iniciada nos primeiros anos dêste século pelo próprio fundador do Instituto Butantan, dr. VITAL BRAZIL. Pouco mais tarde recebeu vigoroso incentivo por Jean Vellard. Foi continuada e zelada, em anos posteriores, por Alcides Prado e chegou em nossas mãos a cêrca de 10 anos. Permutamos exemplares com outros centros de pesquisa; incentivamos a captura desde a Capital de São Paulo até a hinterlândia; percorremos uma grande parte do vale do Paraíba, as zonas em tôrno de Ribeirão Prêto, Belo Horizonte, Ouro Prêto e conseguimos dar novo impulso à remessa dêstes aracnídeos que, em certos anos, começavam, a afluir aos milhares.

Na publicação do presente catálogo damos os nomes científicos, a procedência, os números da coleção e a quantidade de exemplares de cada espécie. Qualquer interessado no assunto poderá inferir da oportunidade e conveniência dêste empreendimento. Deixamos de discutir questões nomenclaturais e de sistemática.

COLEÇÃO ESCORPIÔNICA DO INSTITUTO BUTANTAN, — 1959

1. Fam. *BUTHIDAE* Simon 1879

A. Subfam. *BUTHINAE* Kraepelin 1899

1. Gen. *Buthus* Leach 1815

		N.º Col.	expl.
1.	*B. autralis* (L. 1758) — Algeria meridional	321	3
2.	" *amoreuxi* A. e S. 1812 El Galia, Algéria	322	3
3.	" *aeneas* Koch, 1839 Bon Sdada, Algéria	325	1
4.	" *atlantis* P. 1889 Magdor, Marroccos	326	2
5.	" *acute-carinatus* S. 1883 Israel, Tel Aviv	569	1
6.	" (*Prion.*) bicolor Poc. 1897 Israel, Tel Aviv	573	1
7.	" (*Androct.*) *crassicauda* (Olivier 1807), Zebedan, Iran	702	2
8.	" *hebreus* B. 1908 Israel	570	1
9.	"(*Andr.*) *hoggarensis* (P. 1929) Air, Algéria	323	1
10.	" *judaicus* Simon 1872 Israel	572	1
11.	" *marrocanus* Hirst, 1925 Rabat, Marrocos	327	1
13.	" *mauritanicus* (Poc. 1902) Marrocos-central	324	1
14.	" *occitanus* (Amoreux 1789) — Frais Valleaux, Algéria	185	1
	Algéria	243	1
	Sul da França	328	1
	Kroumierie Marrocos	329	1
	Marrocos central	330	1
	Agadiz, Marrocos	331	1
	Grande Atlas marrocano	332	1

• • •

2. Gen. *Grosphus* Simon 1880

		N.º Col.	expl.
15.	*Grosphus madagascariensis* (Gerv. 1844) — Madagascar	250	1

• • •

3. Gen *Butheolus* Simon 1883

16.	*Butheolus melanurus* (Kessler 1876) Israel	567	1

• • •

4. Gen. *Buthacus* Birula 1911

17.	*Buthacus arenicola* (Sim. 1885) Tunisia-sul	336	1

• • •

5. Gen. *Gompsobuthus* Vachon 1949

18.	*Gompsobuthus werneri* (Birula 1908) — Tombouctou-Saara	334	1

• • •

6. Gen. *Archisometrus* Krpln. 1891

19.	*Arch. mucronatus* (Fabricius 1798) — Cochinchina	259	2

• • •

7. Gen. *Orthochirus* Karsch 1891

20.	*Orthochirus innesi* Simon 1910 — Ouargla-sul da Algéria	333	1

* * *

8. Gen. *Leiurus* (Hemprich e Ehrenberg 1829)

21.	*Leiurus quinquestriatus* (H. & E. 1829) — Egito Superior	335	1
	Algéria	261	1
	Israel-Tel Aviv	569	1

* * *

9. Gen. *Uroplectes* Peters 1861

22.	*Uroplectes occidentalis* Simon 1876 — India Oriental	186	1

* * *

23.	*Babycurus jacksoni* (Poc. 1890) Kilimandjaro, Afr.	252	1

* * *

B. Subfam. *ANANTERINAE* Werner 1934

24.	*Ananteris balzani* Thorell 1891 Botucatu	105	1
	Jaboticabal	38	1
	Serra d'Água	274	1
	Botucatú	293	1
	Rio Claro	410	1
	Agachi	449	1
	Botucatú	514	1
	Maringá	524	1
	Monteiros	582	1

* * *

C. Subfam. *CENTRURINAE* Kraepelin

12. Gen. *Isometrus* H. & E. 1828

25.	*Isometrus maculatus* (de Geer 1778) — Antonina	13	1
	Fortaleza	218	1
	Baturitê, Ceará	7	4
	Ilha de São Sebastião	21	1
	Recife, Pernambuco	48	1
	Fortaleza, Ceará	87	1
	São Sebastião	249	1
	Pequenas Antilhas	254	2
	Pará	257	1
	Belém do Pará	368	2
	Bordat Montabo, Guiana Francesa	374	4
	Duna — no Rio Solimões	526	2
	Santarem — Pará	534	1
	Antonina — Paraná	562, 563 e 564	13
	Fortaleza, Ceará	613	1
	Manaus, Amazonas	695	1
	Rio Prêto, Manaus	696	1

* * *

13. Gen. *Tityus* C. L. Koch 1836

No.		Reg.	Qty
26.	*Tityus amazonicus* Giltay 1928 — Belém do Pará 521-1;370	416	1 + 1
27.	*Tityus bolivianus (andinus)* Krpln. 1895 — Sta. Rosa, Peru	531	6
	" " acuadorensis " 1896 Rio Chinchipe	532	1
	Lhêma, Peru, 2.000 m	389 e 390	5
28.	*Tityus blaseri* M. L. 1931 — Leopoldo Bulhões, Goiás,	65	1
29.	*Tityus cambridgei* Pocock 1897 — Pequ. Antilhas	187	1
	404,415-3 512; 355.		
	Belém do Pará 354, 355, 356, 367, 386	299	1
	Bordat Montabo, Guiana Franc. 377-3	375	1
	Walpés, região de Janavete, Amazonas	426	1
	Ilha de St. Ana, Amapá	522	1
	Serra do navio, Amapá	674	1
	Tabatinga, Amazonas	679	1
	Igarape do Tarumã, Manaus	697	1
30.	*Tityus intermedius* Borelli 1899 — Baixo Guadk. S. Paulo	12	1
	Itá, Espírito Santo	28	3
	Dobragi, Minas	39	1
	Colômbia	49	1
31.	*Tityus lutzi* Giltay 1928 — Presidente Epitácio	81	2
	São Julião, Minas	287	1
	Presidente Venceslau	283	1
	Avaré	295	1
	Rancharia	419	1
	Agachi	536	1
32.	*Tityus paraguayensis* Krpln. 1895 — Terenos, M. Gr.	5	1
	Ilha do Bananal e Mato Verde, M. Gr.	143	5
	Ilha do Bananal	178	5
	Terenos 52 — 4	24	1
	Est. Rio Branco, M. Gr.	541	1
	Aragarças, Goiás.	544	1
	Rio Grande do Sul, 26		
33.	*Tityus stigmurus* (Thorell 1877) — Recife, 43, 44, 45, 50	4	1
	Ceará, Museu Rocha	575	1
34.	*Tityus costatus* (Karsch 1879) — Rio Grande do Sul	227	1
	Dobragi, Minas	40	1
	Caiacanga, Paraná	41	1
	Areal, S. Paulo	42	1
	Ilha de São Sebastião, S. Paulo 279	245	1
	Palmeira, Paraná	284	1
	Campo do Tenente, Paraná	286	1
	Socego	425	1
35.	*Tityus trinitatis* Poc. 1897 — Serra da Pacaraima	432	1
	Trinidad	306	5
36.	*Tityus sectus* M. L. 1934 — Agachi, M. Gr.	451	1
37.	*Tityus Strandi* Werner 1939 — Norte de Goiás com Maranh.	618	1

38. *Tityus trivittatus trivittatus* Krpln. 1898

Joaquim Mortinho, Paraná 140		103	1
Cruz Machado, Paraná		171	1
Caiacanga, Paraná		586	1
T. tr. charreyroni Vell. 1932 — Leopoldina, Araguia 91-1		287	1
228-8 " " *confluens Borelli* 1899 — Pôrto União Vitória, Par.		244	2
Aquidauana		285	1
Itapeva, S. Paulo		312	3
Rio Branco, Paraná		561	1
T. tr. dorsomaculatus (Lutz e Mello 1922)			
Ouro Prêto		294	2
Rio Casca, Minas	548	547	8
Parque Itatiaia		574	1

39. *Tityus carinatoides* M. L. 1945 — Jaguariaiva, Paraná 341 1

40. *Tityus serrulatus serrulatus* Lutz e Mello 1922

a) Localidades, de onde recebemos:

1. Estado de São Paulo:

a) Central do Brasil — Embaú, Cachoeira, Lorena, Guaratinguetá, Aparecida, Roseira, Pindamonhangaba, São José dos Campos (terrenos da General Motors).

b) Capital de São Paulo e arredores (União dos Refinadores, Osasco, São Bernardo (trazidos com madeira, xarxim, mercadorias).

c) Mogiana — Socorro, Serra Negra, Itapira, Mogi-Mirim, Amparo, Bragança.

Localidades, N.º do catálogo, quantidades de escorpiões recebidos:

1. ESTADO DE SÃO PAULO:

a) *Capital e arredores:* União dos Refinadores, Capital — N.º 670-2 explrs.

Osasco — N.º 704-4 explrs.

São Bernardo — N.º 705-3 explrs.

b) Estr. Ferro Central: Embaú — N.º 149-3 explrs.

Cachoeira — N.º 706-5 explrs.

Lorena — N.º 707-4 explrs.

Guaratinguetá — N.º 107-1 ex. N.º 148-6 explrs.

Aparecida — N.º 200-6 explrs.; N.º 209-1 ex.; 226-4 explrs.; 219-1 ex.; 225-3 explrs.

Roseira — N.º 119-1 ex.

Pindamonhangaba — N.º 708-3 explrs.

São José dos Campos (nos terrenos da General Motors do Brasil S.A.) — N.º 709-3 explrs.

c) Cia. Mogiana de Estrada de Ferro:

Socorro — N.º 94-4 exempls.; N.º 104-1 ex.; N.º 147-1 ex.

Serra Negra — N.º 710-2 explrs.

Itapira — N.º 711-3 explrs.

Mogi-Mirim — N.º 116-1 ex.

Amparo — N.º 102-1 ex.

Bragança — N.º 712-3 explrs.

d) Cia. Paulista de Estrada de Ferro: (Noroeste):

Barretos — N.º 713-4 explrs.

Colina — N.º 714-3 explrs.

Bebedouro — N.º 715-2 explrs.

Pitangueiras — N.º 716-2 explrs.

Pontal — N.º 129-1 ex.; 181-3 ex.; 203-1 ex.; 372-1 ex.;

Jaboticabal — N.º 716-2 explrs.

Sertãosinho — N.º 717-3 explrs.

Jardinópolis — N.º 718-4 explrs.

Batatais — N.º 719-2 explrs.

Brodosqui — N.º 720-3 explrs.

Ribeirão Prêto — N.º 71-1 ex.; 315-1 ex.; 459 ex.; 460-3 ex.; 461-16 ex.

Nova Granada — N.º 214-1 ex.; 217-1 ex.;

Moreira Cesar — N.º 190-1 ex.; 220-1 ex.; 314-1 ex.;

João de Oliveira — N.º 168-1 ex.;

II. ESTADO DO RIO DE JANEIRO:

Marechal Jardim — N.º 86-2 ex.; 211-2 ex.;

Vassouras — N.º 721-2 explrs.;

Sumidouro — N.º 722-3 explrs.

III. ESTADO DE GOIÁS:

Campina — N.º 723-2 explrs.;

Goiania — N.º 348-1 ex.;

Catalão — N.º 724-4 explrs.;

Corumbaiba — N.º 725-3 explrs.;

Ipamerí — N.º 726-4 explrs.;

Pires do Rio — N.º 727-3 explrs.;

Orizona — N.º 728-3 explrs.;

Silvania — N.º 730-3 explrs.

Anápolis — N.º 730-3 explrs.

IV. ESTADO DE MINAS GERAIS:

Belo Horizonte — N.º 731-5 explrs.

Rio Guandú — N.º 19-2 ex.;

Sanambá — N.º 183-2 ex.; 98-3 ex.; 201-1 ex.; 210-1 ex.;

Tupaciguará — N.º 191-6 explrs.;

Pôrto Farias — N.º 204-1 ex.;

Nova Era — N.º 676-1 ex.; 693-1 ex.;

Passagem — N.º 732-4 explrs.

Mariana — N.º 733-3 explrs.;

Diamantina — N.º 734-2 explrs.;

Corinto — N.º 735-3 explrs.;

Juíz de Fora — N.º 736-4 explrs.;

ricana e provàvelmente a *Blatta germanica*, 1 espécie de *GRYLLIDAE*, 2 espécies de *FORMICIDAE* e a aranha *Heteropoda venatoria*.

No alto dos morros vimos raras vezes uma borboleta diurna.

Entre os mamíferos é raro o *Mus musculus*, evidentemente trazido pelo homem com os mantimentos. *Felis ochreata* domestica é rara também, e foi avistada por nós nas encostas do Paredão e do Pico do Vigia. Mal foi estabelecido o acampamento e a cozinha entrou em funcionamento, acercavam-se os gatos do homem, ariscos e timidos ainda. *Ovis aries, Capra hircus* e *Sus scrofa domestica*, presentes ainda hoje em Trindade em quantidades apreciáveis, atestam que esta ilha deserta fora abordada, há cêrca de 200 anos ou mesmo mais, pelos mesmos capitães que descobriram outras ilhas do Atlântico Pacífico, expondo em cada uma delas a mesma grei de animais domésticos. A ilha da Pascoa, p. ex., visitada em 1786 por La Pérouse, foi presenteada por êste também com casais de porcos, ovelhas e cabras. O carneiro e o cabrito desenvolveram hábitos montanheses. Apresentam-se robustos, muito musculosos, de dimensões avantajadas, os primeiros com lã mais longa que a dos da terra firme. Galgam pelas encostas mais íngremes, andando geralmente em pequenas greis de 8 a 15 . Pelo que pudemos contar devem existir ainda hoje várias centenas de exemplares de um e de outro. Suas trilhas percorrem os altiplanos dos terraços superiores, onde ainda há vegetação, como no topo da Crista de Galo, entre os morros de Trindade e Desejado, em direção sul. Chegam a descer também pela região do cemitério até algumas centenas de metros dos acampamentos. Perante o homem mostram reserva. A uma distância de 50 metros costumam retirar-se, sem correr, entretanto, guardando sempre a mesma distância. Vimos alguns filhotes, tanto de carneiros como de cabras. Num alpendre, abandonado desde 1916 e que então servia de paiol de pólvora, encontramos diversos esqueletos de carneiros. Pegos de surprêsa, principalmente os filhotes, e tratados bem, aceitam alimento da mão do homem e em poucos minutos se acostumam à companhia humana.

Sus scrofa doméstica, exposta na ilha por HALLEY, segundo documentos antigos, já conta hoje com 259 anos de vida insular. Sofreu uma regressão biológica, tendo voltado já à facies do J a v a l í europeu. O focinho, principalmente dos cachaços, é muito prolongado; as duas prêsas são grandes e divergentes; as orelhas eretas; a cauda longa, reta também, com tufo terminal de pêlos. Para os porcos a vida não é "fácil" em Trindade, pois nem sempre há ovos e filhotes de tartaruga. Os sirís e peixes são mais ágeis e as aves nidificam sôbre as rochas. Realmente vimos muito poucos porcos e assim mesmo geralmente só à grande distância. Os cachaços parecem andar isolados; as fêmeas e filhotes em bandos de 3 a 5, separados dos carneiros e das cabras. Estudamos algumas carcaças.

Por tudo que observamos a respeito dêstes três animais domésticos, indesejáveis em Trindade em face da vegetação em franca regressão e da preservação dos locais de postura da gigantesca tartaruga marinha, impõe-se sua retirada da ilha. Devem constituir interessante material de estudo, principalmente para os geneticistas dos estabelecimentos de pesquisa aplicada. Mas, parece-nos, ser necessário agir-se ràpidamente para prevenir seu total abatimento indiscriminado pela milícia, que se encontra atualmente em Trindade.

Quando chegamos à ilha, já tinha passado o tempo de postura da gigantesca tartaruga marinha. Pernoitando nas areias fôfas da praia, que tem o seu nome, apesar de uma vigília ininterrupta, não vimos nenhum movimento. Contamos, entretanto, cêrca de 60 grandes "funis" de postura de ovos, tanto na praia dos Andradas (poucas) na das Tartarugas (a maioria), em duas outras pequenas praias, com areia vermelha misturada com cinza vulcânica, perto do tunel (algumas) e na areia da praia do Príncipe (duas).

A vida marinha é abundante e variada: muitos peixes, em diversas espécies, equinodermas, estrêlas do mar, várias espécies de sirís; enfim tôda a fauna marítima que costuma viver em praias coralíferas de clima tropical; bastante moreias e lagostas.

O mundo alado se restringe a algumas espécies de aves marinhas, de vôo longo. Nenhum pássaro canôro. Nenhuma serpente ou lagarto. Insetos algumas dezenas de espécies, principalmente sôbre carniças e cadaveres de porcos e carneiros. Nenhum mosquito ou borrachudo. Uma impressionante chusma de *musca doméstica,* presente tanto nas praias, principalmente em torno das habitações humanas, recem-construidas, como também nas maiores elevações, a 600 metros, em zonas abrigadas dos ventos. As fezes porcinas garantem o desenvolvimento das larvas das moscas. Acresce a falta absoluta de instalações sanitárias para as várias dezenas de homens, pelo menos durante as primeiras semanas desta expedição.

O gafanhoto, *Schistocera paranensis*, muito abundante principalmente no plano inclinado, mais ou menos abrigado dos ventos mais violentos, atrás da praia dos Portuguêses, em direção ao cemitério, constitui sério perigo para a pouca vegetação dos baixos da ilha. Parece que não conseguiu firmar-se nas grandes elevações, impedindo os ventos o seu vôo. A ausência absoluta de pássaros de porte médio e pequeno proporcionou-lhe um item favorável à propagação. Ao se sacudirem os ramos dos arbustos, principalmente de *Waltheria americana,* esvoaçam chusmas de gafanhotos. Adultos e todos os estadios larvais ocorrem em grande quantidade. Seu vôo precavido é sempre apenas rasteiro; suas asas parecem ser mais curtas em comparação com as dos da terra firme, que são exímios "voadores". Perscrutando sua área de dispersão, pudemos constatar que seu grande inimigo é o vento. Nas encostas, varridas pelos

vendavais, mesmo quando há vegetação, está o gafanhoto ausente; nos vales abrigados acumula-se em grandes quantidades; nos topos das montanhas já existe, porém, em quantidades toleráveis.

Fauna araenológica

a) *Coleta de material*:

Após sondagens prévias concordaram os companheiros, para garantia da originalidade de nossos trabalhos, que a *fauna araenológica* de Trindade, seu habitat preferido e as condições ecológicas e sua adaptabilidade às mesmas, constituissem a nossa principal preocupação.

Primeiro fizemos observações e capturas nas regiões praianas. Partindo do acampamento da Casa Grande, exploramos os madeiramentos, a face inferior dos telhados, os amontoados de tijolos, restos de construções antigas em desmoronamento, a face inferior, escura, dos porões sob as choupanas abandonadas.

Depois dedicamos a nossa atenção aos coqueiros, à amendoeira e principalmente aos filetes d'água, em torno dos quais se formara um tapete baixo de relva sempre verde, encimada por arbustos, ressequidos parcialmente.

Finalmente perscrutamos tôda a praia dos Portuguêses, a dos Cabritos, a dos Andradas, as duas menores antes do tunel, o outro lado do tunel e a praia do Príncipe até aos Cinco Farilhões.

A segunda parte de nossos planos, após termos transferido o nosso acampamento para o antigo paiol de pólvora, construido em 1916, nos fez executar diversas penetrações pelas vertentes dos morros. Partimos sempre das praias mencionadas e exploramos o íngreme "Hinterland", virando pedras, lages e o que encontramos; espiando buracos naturais; perscrutando vãos de raízes de arbustos, etc..

Finalmente fizemos ascensões aos contrafortes e aos próprios massiços, os Picos do Castelo, o Vermelho, o Verde, o Branco, etc..

Nestas andanças, por vêzes nada fáceis, colhemos cêrca de 300 aracnídeos das seguintes espécies:

Fam.	*HETEROPODIDAE*	— *Heteropoda venatoria* (L. 1767)	— 114	exemplares;
"	*ARGYOPIDAE*	— *Tetragnatha antillana* Simon 1897	— 55	"
"	"	— *Araneus labyrintheus* (Hentz 1847)	— 106	"
"	"	— *Argyope trifasciata* (Forskal 1775)	— 5	"
"	*SALTICIDAE*	— *Sidusa festiva* (Peckh. 1896)	— 4	"

Das primeiras 3 espécies colhemos machos, fêmeas, filhotes em diversas fases evolutivas e ootecas, afim de possibilitar um estudo detalhado. A extrema utilidade destas aranhas na ilha nos impediu de colhermos maior número.

b) *Habitat, alimentação e condições ambientais*:

Embora estivéssemos cientes de antemão, que não se poderia esperar a existência de espécies autóctones em Trindade, tivemos, contudo, a nossa curiosidade plenamente satisfeita em outro sentido. Revelou-nos a fauna aracnológica desta ilha a ingente luta pela subrevivência das espécies com tôda as sequelas biológicas: escolha de um habitat apropriado, garantia de um mínimo de alimentação, adaptabilidade genética e funcional às condições ambientais, etc.. A espécie, que conseguira vencer tôdas estas dificuldades, poderia espalhar-se, aos poucos, sôbre novas áreas, onde a aguardariam novas dificuldades para serem vencidas, etc.. Vencedora e senhora de tôdas as situações "biológicas", poderia, finalmente, tomar conta de tôda a ilha, multiplicando-se cada vez mais.

Outra espécie, ao contrário, menos dotada biològicamente, permaneceria em apenas uma área restrita, onde encontrasse as melhores condições ambientais e daí não se afastaria ainda que, na ância de sobreviver, se multiplicasse aí mesmo o mais que pudesse.

Em face do que conhecemos hoje sôbre a enorme adaptabilidade das aranhas, principalmente das da família *ARGYOPIDAE*, podemos concluir que certamente terão abordado à Trindade várias dezenas de espécies, das quais a maioria não conseguiu sobreviver.

Os parcos recursos não permitem também a cohabitação pacífica de espécies muito afins. Os mesmos costumes e hábitos as tornariam inimigas implacáveis. De fato verificamos que as 5 espécies de Trindade pertencem a 5 gêneros e 3 famílias diferentes, muito distantes uma das outras. Ademais, todos os exemplares das 5 espécies, com excepção apenas de *H. venatória*, mantem atualmente cada uma, uma área biológica muito restrita, de poucos metros quadrados em ambiente ecológico próprio, respeitado rigorosamente pela outra espécie. *S. festiva* saltita sôbre o madeiramento dos alpendres; *H. venatória* vive no escuro, na face inferior das pedras, sob os telhados e o madeiramento das construções; *T. antillana* se estabeleceu numa área de cêrca de 300 metros quadrados, por sôbre os filetes ramificados da água dôce que aí corre mansamente; *A. labyrintheus* vive sôbre a única amendoeira da ilha, a poucos metros da praia, passando da árvore para o chão e vice-versa e *A. trifasciata* escolheu como habitat o chão, os buracos naturais, em cujo derredor existe a relva verdejante, banhada pelos filetes d'água, sem misturar-se com sua vizinha, a *T. antillana*.

Acentuando mais ainda êste biotopo específico, como fator garantidor de uma cohabitação pacífica em ambiente pequeno e adverso, teem tôdas estas espécies hábitos de vida, que as distanciam ainda mais: *Sidusa e Heteropoda são errantes;* caçam seu alimento com extrema astúcia e agilidade. *Tetragnatha, Araneus* e *Argyope* são obrigatòriamente sedentárias, fazedoras de teias, com as quais garantem sua subsistência

A diferenciação biológica, porém, não para aí: *Venatória* é de hábitos essencialmente noturnos; dorme de dia e caça de noite; as restantes são diurnas, espreitando sua prêsa à luz do dia e dormindo de noite

O alimento principal de *Sidusa* é constituido pela mosca doméstica, surpreendida no pouso ou no vôo rasteiro; *H. venatória* dá caça aos grilos, às baratas e aos gafanhotos principalmente. Esta diversidade no alimento vem a garantir a subsistência das 2 espécies. A alimentação de *T. antillana*, de *A. trifasciata* e de *A. labyrintheus* consiste essencialmente de homópteros e dípteros. Mesmo assim não se tornam concorrentes pràticamente, pois suspendem seus aparelhos de captura, as teias, de uma maneira bem diversa e individual, além de estas teias apresentarem particularidades específicas. As teias de *Araneus* encontram-se entre os ramos da amendoeira, a mais ou menos 4 a 5 metros sôbre o solo, a receber os insetos alados que aí costumam abordar; as de *Tetragnatha* repousam horizontalmente ou em ângulo sôbre pequenos arbutos, diretamente por cima da água dôce e capturam insetos voadores, que por sua vez procuram estas águas; as de *Argyope*, finalmente, construidas em vãos do chão, apreendem outros tipos de insetos.

O próprio aspecto externo das 5 espécies é chocantemente diferente: *Heteropoda* é uma aranha grande, robusta, agilíssima, laterígrada, com corpo dorsalmente achatado, marron uniforme, muito espinhosa e com extremidades longas; *Sidusa* é minúscula, elegante, com corpo alongado e roliço e olhos muito grandes na testa, de colorido marrom escuro, quase prêto e se movimenta aos saltos; *Tetragnatha* apresenta corpo muito alongado, delgado, marron muito claro, com as quelíceras descomunalmente protraídas; *Argyope trifasciata* tem abdomen com a forma de uma barrica, com cintas transversais de vivo colorido e *Araneus labyrintheus*, finalmente, tem o aspecto de uma bolinha, côr de cinza, com perninhas extremamente curtas.

O resultado da convergência de todos êstes fatores — microambiente específico, alimento diverso, hábitos de vida diferentes, etc.. — garante realmente uma cohabitação não prejudicial a nenhuma das espécies no mesmo ambiente relativamente pequeno.

Quanto aos indivíduos da mesma espécie constatamos que as três representantes da família *ARGYOPIDAE* vivem em íntima sociedade. Várias dezenas de teias, individuais embora, mas com os fios de moldura e de apoio em comum, são juxtapostas ou sobrepostas ou construidas uma em ângulo às vizinhas. Sem cerimônia alguma passeiam as aranhas sôbre as teias vizinhas, filhotes e machos tolerados pelas fêmeas adultas, umas comendo, outras mergulhadas sob a água, outras ainda remendando sua teia, partida pelas chuvas ou ventos. A própria *H. venatória*, de índole alhures pouco sociável, repousa na ilha em número de 2-3 sob a face inferior da mesma pedra, sob a mesma trave ou a mesma

telha, a fêmea sustentando a ooteca sob o esterno, os machos e os filhotes nas diversas fases de crescimento ao lado.

O elevado número de indivíduos da mesma espécie, muitas vêzes restrita a um ambiente pequeníssimo, testemunha sua perfeita adaptação ao local. No interior de 5 cooteeas de *H. venatória* contamos 163-326-394-425 e 507 ovos embrionados. A relação entre fêmeas e machos é de cêrca de 4:1. Várias centenas ou talvez milhares de indivíduos proliferam em cada micro-ambiente específico.

Mesmo assim, porém, as condições em Trindade não são "róseas" para a fauna aracnológica. *A. labyrintheus,* p. ex., parece "nidificar" realmente apenas sôbre a única amendoeira existente ao lado da Casa Grande. Com a possível morte desta árvore, selar-se-á provàvelmente também o seu destino, pois não conseguiu vencer os obstáculos ambientais e propagar-se para outras plagas da ilha. O vento, quase que incessante, interfere profundamente no índice de sua sobrevivência. Ao chegar uma borrasca, com rajadas fortes e chuvas, despencam-se as aranhas por um ténue fio da árvore e se refugiam sob as folhas e pedras no chão. Quantas não morrerão neste contínuo abandono da moradia!? Mal tocam contra o chão, ficam imóveis por uns instantes, do geito como caem, de costas, do lado, com as perninhas encolhidas. Depois movimentam-se e desaparecem sob as folhas.

A sorte de *T. antillana* também não é brilhante em Trindade. Tendo necessidade biológica de uma água perene, parada ou suàvemente corrente, e vivendo do que lhes fornecem as teias, suspensas sôbre arbustos, não tem possibilidade de mudar-se para outras regiões. Onde estão atualmente são castigadas pelos ventos e as chuvas. Desviam-se, então, pelos fios condutores para baixo, refugiando-se nos vãos das margens do regato ou mesmo sob a superfície da água. Só quando há sol e calmaria, remendam as teias ou descançam na face inferior da teia, com os 2 pares de pernas anteriores dirigidos para a frente, o quarto par para trás, abraçando alguns fios com o terceiro par, bem mais curto do que os restantes. Se houver uma mudança no curso daqueles filetes d'água, p. ex., pela canalisação para novos acampamentos, dificilmente esta espécie poderá sobreviver.

Apenas *H. venatória* tem conseguido conquistar novas áreas. Existe hoje dentro dos galpões antigos de madeira na praia dos Portuguêses e em tôda a região circunvizinha do campo, onde vive sob pedras principalmente, nas ruinas de velhas construções. Conseguiu mesmo vencer as encostas e subir pelos morros, multiplicando-se enormemente também nos picos mais elevados, como no "Desejado". Existe ainda na praia dos Andradas, na região do cemitério, na praia das tartarugas, nas encostas do morro do Paredão e na descida para a praia do Príncipe. Repousando de dia, aderente aos vãos da face inferior

das pedras, sabe aproveitar-se ao máximo do calor do Sol, permanecendo de manhã no lado correspondente ao oriente e acompanhando o percurso do astro durante o dia, de maneira que de tarde está do lado do ocidente. O alimento — grilos, baratas — está no chão, sob a mesma pedra, sendo usado apenas com parcimônia. Nas encostas, onde existem avalanches e predominam os ventos constantes, e onde não se encontram êstes insetos sob as pedras, também não há esta aranha.

c) *Proveniência e antiguidade*:

As próprias aranhas oferecem a resposta sôbre sua proveniência. *Tetragnatha antillana* é freqüente nas Grandes e Pequenas Antilhas e na América Central — Pôrto Rico, Guatemala e Costa Rica. *Araneus labyrintheus* é frequente igualmente em diversas ilhas do Atlântico tropical. *Sidusa festiva* é de Guatemala e *Heteropoda venatória* é um hóspede frequente nos armazens de madeira de quase todos os portos marítimos da América Central e das Antilhas, sendo, entretanto, rara já no Rio de Janeiro. Com os embarques, principalmente de frutas — bananas — é levada para continentes distantes.

Tudo parece, pois, indicar que elas provieram das Antilhas ou da América Central ou ainda, parcialmente, da Venezuela ou das Guianas, e não das costas brasileiras que ficam em frente a Trindade. Devem ter sido trazidas pelas caravelas, há mais de 1 ou 2 séculos.

d) *Descrição das espécies*:

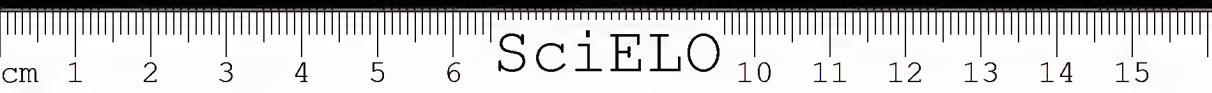
Nossa experiência nos ensinou que a média de vida de *T. antillana* e *A. labyrintheus* é apenas de 1 ano e 6 meses e a de *H. venatória* de cêrca de dois anos e meio. A permanência destas espécies em Trindade, durante 1 ou 2 séculos, em condições ambientais pelo menos "extranhas" em comparação com as de seu país de origem, deveria ter provocado já certos fenômenos de adaptação ao novo ambiente, visíveis mesmo no aspecto externo e transmitidos e acentuados de geração em geração. É o que de fato constatamos nas 3 espécies citadas. Apresentam elas já caracteres "populacionais", ora já "fixados" genèticamente ora ainda em "flutuação", como pudemos comprovar pela comparação de elevado número de indivíduos.

Na descrição das espécies vamos trazer aqui apenas o que nos parece ser novo nos indivíduos de Trindade, omitindo a caracterização geral, que poderá ser lida nas publicação dos autores.

1. *Heteropoda venatória* (L. 1767)

Material estudado:

35 fêmeas adultas;

7 fêmeas antes da muda sexual;

5 fêmeas ainda mais jovens;
5 fêmeas "filhotes";
31 machos adultos;
9 machos, antes da muda sexual.

Epígino: A figura 1 apresenta a evolução do epígino nas fêmeas, desde 2 manchinhas redondas, quitinisadas, localisadas por cima do sulco epigástrico em indivíduos bem jovens (a), até duas trabéculas e mais duas estrias anteriores em adolescentes (b), o aparecimento dos dois orifícios vulvares, unidos externamente por uma trabécula, com duas estrias anteriores (c), antes da muda sexual e finalmente o epígino adulto (d). 4 fases de epígino são características para cada idade e independem das dimensões que a aranha apresente no momento, isto é, pode haver uma aranha muito grande, parecendo ser adulta, mas cujo epígino está ainda na fase do tipo c). Esta, portanto, não é ainda adulta. Por outro lado pode haver uma *H. venatória* pequena, parecendo filhote ainda, mas com epígino já formado. É adulta, ainda que menor que a média das outras.

Isto é importante, porque autores menos avisados descreveram espécies novas ùnicamente pelo aspecto diferente do epígino.

Olhos: A figura 2 apresenta os 8 olhos, sua distância da fronte a), suas dimensões e as distâncias uns dos outros, sua disposição em duas fileiras, uma anterior de 4 e outra posterior, também de 4, passando uma linha reta à borda anterior da primeira fila a ser tangente dos 4 olhos anteriores (b) e uma reta, tangente à borda posterior do Médios Posteriores a cortar um segmento dos L.P. (c).

Realmente surpreendeu-nos esta rigorosa constância da "formula ocular", a repetir-se exatamente em todos os indivíduos examinados, o que não costuma verificar-se em quase nenhuma espécie de aranha, inclusive as caranguejeiras, da terra firme. Parece-nos um comprovante de que, de fato, todos os indivíduos de *H. venatória,* atualmente existentes em Trindade, sejam descendentes diretos de uma só mãe.

Denteação das margens das quelíceras:

Também na denteação inferior e superior que guarnece as duas margens do sulco, em que pousa a quelícera encolhida, verificamos, em todos os exemplares, uma concordância absoluta, de conformidade com o que apresenta a figura 3. Na margem inferior há 4 dentes enfileirados, sendo os 3 primeiros maiores, equidistantes e de dimensões iguais. Na margem superior há 1 dente maior, à altura do terceiro inferior, ladeado por 2 menores e mais 2 menores ainda no extremo interno. Dentículos minúsculos, dispostos em duas fileiras longitudinais guarnecem o próprio sulco e a parte basal da margem superior.

Lábio e ancas dos palpos: Lábio um pouco mais longo que largo, uma e meia vêz mais curto que os lobos maxilares do palpos (fig. 4). Áreas externas e apicais do lábio e dos lobos maxilares dotados de longos pêlos; quase sem pêlos nas zonas centrais.

Acúleos nos palpos e nas pernas: (Fig. 5):

Em 30 fêmeas adultas aferimos cuidadosamente o número e a posição dos longos espinhos pretos que guarnecem os fêmures, as patelas, as tíbias e os metatarsos, encontrando uma fórmula quase que 100% constante nos fêmures (2.280 espinhos foram contados), nas tíbias (2.640 acúleos contados) e nos metatarsos (4 divergências apenas em 2.100 aferições). Apenas nas patelas existe variação entre 0 a 2 espinhos.

QUADRO I

Fórmula dos espinhos nos 5 pares de extremidades nas fêmeas				
	FÊMURES	PATELAS	TÍBIAS	METATARSOS
Palpos..........	1 + 2 + 2	1 + 1	4 + 2	4 + 4
Perna I........	2 + 3 + 3	1 + 1	2 + 4 + 2 + 2	2 + 2
Perna II........	2 + 3 + 3	0 + 1	2 + 4 + 2 + 2	2 + 2
Perna III.......	3 + 3 + 3	1 + 0	2 + 2 + 4 + 2	4 + 3
Perna IV.......	2 + 2 + 3	1 + 1	2 + 2 + 4 + 2	4 + 4 + 4

Se nos aprofundamos nestes detalhes, que poderiam parecer de pouca importância para um não especialista, foi para demonstrar que a constância desta fórmula constitui um dos fatores a mais a comprovar o caracter populacional de *H. venatória* em Trindade.

Nas 30 fêmeas adultas, examinadas, verificamos apenas as seguintes divergências da fórmula do quadro I:

2+3+2 espinhos no femur I — apenas 1 vez;
3+3+3 " " " II — " 1 ";
2+2+4 " " " IV — " 1 ".
3+2 espinhos no metatarso I — apenas 1 vez;
3+2 " " " II — " 1 ";
4+2 " " " III — " 1 ".

Nenhuma variação foi encontrada nas 30 fêmeas na contagem dos espinhos das tíbias em 300 extremidades. Os 4 metatarsos são escopulados até a base, apoiando-se os acúleos, quando deitados, em "leitos", isentos de pêlos. Apenas no 3.º e 4.º par de pernas localizam-se os espinhos laterais por fóra das escópulas.

QUADRO II

Fórmula dos espinhos nos 5 pares de extremidades de 15 machos adultos

	FÊMURES	PATELAS	TÍBIAS	METATARSOS
Palpos..........	1 + 2 + 2	1 + 1	3 + 1	—
Perna I.......	2 + 3 + 3	1 + 1	4 + 4 + 4 + 2	4 + 2
Perna II.......	2 + 3 + 3	1 + 1	4 + 4 + 4 + 2	4 + 2
Perna III.......	3 + 3 + 3	1 + 1	3 + 4 + 3 + 2	4 + 3
Perna IV.......	2 + 2 + 3	1 + 1	3 + 4 + 3 + 2	4 + 4 + 4

Nos 15 machos examinados constatamos sempre a mesma fórmula de espinhos nos fêmures, nas patelas e nos metatarsos de tôdas as extremidades; apenas na tíbia I observamos 1 vez 5+5+4+2, na tíbia II duas vêzes 5+4+4+2 e na tíbia III também duas vêzes 3+2+5+2.

QUADRO III

Fórmula dos espinhos nos 5 pares de extremidades de 7 machos quasi adultos

	FÊMURES	PATELAS	TÍBIAS	METATARSOS
Palpos..........	1 + 2 + 2	1 + 1	4 + 2	4 + 2 ou 3 + 2
Perna I.......	2 + 3 + 3	1 + 1	3 + 4 + 3 + 2	4 + 2
Perna II.......	2 + 3 + 3	1 + 1	3 + 4 + 3 + 2	4 + 2
Perna III.......	3 + 3 + 3	1 + 1	3 + 3 + 4 + 2	4 + 3
Perna IV.......	2 + 3 + 3	1 + 1	3 + 3 + 4 + 2	4 + 4 + 4

QUADRO IV

Fórmula dos espinhos nas extremidades de 8 machos jovens

	FÊMURES	PATELAS	TÍBIAS	METATARSOS
Palpos..........	1 + 2 + 2	1 + 1	4 + 2	3 ou 4 + 2
Perna I.......	2 + 3 + 3	1 + 1	2 + 4 + 3 + 2	4 + 2
Perna II.......	2 + 3 + 3	1 + 1	2 + 4 + 3 + 2	4 + 2
Perna III.......	3 + 3 + 3	1 + 1	2 + 2 + 4 + 2	4 + 3
Perna IV.......	2 + 3 + 3	1 + 1	2 + 2 + 4 + 2	4 + 4 + 4

Garras das pernas: A figura 9 apresenta uma garra, quase inteiramente encoberta pelos tufos subungueais, com 11 dentes enfileirados, simples, sendo

QUADRO V

Fórmula dos espinhos nas extremidades de 7 fêmeas jovens				
	FÊMURES	PATELAS	TÍBIAS	METATARSOS
Palpos..........	1 + 2 + 2	1 + 1	4 + 2	4 + 2
Perna I.......	2 + 3 + 3	1 + 1	2 + 4 + 2 + 2	2 + 2
Perna II.......	2 + 3 + 3	1 + 1	2 + 4 + 2 + 2	2 + 2
Perna III.......	3 + 3 + 3	1 + 1	2 + 2 + 4 + 2	4 + 3
Perna IV.......	2 + 2 + 3	0 + 1	2 + 2 + 4 + 2	4 + 4 + 4

os apicais os maiores e mais distanciados, decrescendo seu tamanho e distância em direção à base. A constância de dentes repete-se de exemplar em exemplar.

Órgão copulador do macho: A figura 10 apresenta a extremidade distal da tíbia de um palpo, vendo-se robustos espinhos e uma apófise bífida interna. Na figura 11 é representado o bulbo em posição de repouso. O mesmo é extraído e visto de perfil na figura 12. Todo o órgão copulador, com o cymbium, o cálice, a "guia" e o êmbolo, são vistos na figura 13.

2. *Tetragnatha antillana* Simon 1897

Material estudado:
19 machos adultos;
5 machos antes da ecdise sexual;
28 fêmeas adultas;
3 fêmeas adolescentes.

Colorido: — fêmeas — cefalotorax e dorso do abdomen amarelos, reticulados; quelíceras marrons; espinhos pretos; segunda metade do dorso do abdomen com estrias longitudinais pálidas, ladeadas por 3 pares de manchas cinzentas; ancas dos palpos com pêlos escuros; esterno marron amarelado; também o lábio, com orla anterior amarela; ventre amarelo, com larga faixa central, longitudinal, preta, a percorrer tôda a extensão do mesmo, mais larga na primeira metade.

Machos — Cefalotorax e abdomen amarelo claros, principalmente o último, que é "salpicado" de inúmeras manchinhas amarelas minúsculas. Fronte, artículo basal das quelíceras e bulbos copuladores côr de chocolate; olhos, quelíceras e espinhos negros; coxas das pernas amarelo claras, os artículos restantes marrons; ventre com faixa mediana longitudinal escura, até as fiandeiras.

Olhos: 2 filas oculares com 4 olhos cada, ocupando quase tôda a largura da fronte; as 2 filas paralelas e recurvas; uma reta tangente à borda posterior dos M. A. passa tangendo a borda posterior dos L. A.; M. A., M. P. e L. P.

pràticamente do mesmo tamanho; L. A. duas e meia vêzes menores que os L. P., os 4 medianos formam a figura de um trapézio, mais estreito na frente; M. A. distantes entre si um pouco menos de 1 diâmetro, dos L. A. exatamente 2 diâmetros, dos M. P. um pouco mais de 1 diâmetro e dos L. P. quase 3 diâmetros; M. P. distantes entre si mais de 1 diâmetro, dos L. P. quase 2 diâmetros.

Denteação do sulco quelíceral:

Fêmeas — compare as figuras 14 e 15;

Machos — compare as figuras 16 e 17.

Há variação no número de dentes, tanto da margem superior como na inferior, nas fêmeas e nos machos adultos. O quadro VI apresenta os limites desta variação em 12 fêmeas e 15 machos.

QUADRO VI

Variação no número de dentes no sulco queliceral																
Margem superior	8	9	9	9	9	10	10	10	11	11	12	12				fêmeas
Margem inferior	10	10	11	12	14	13	11	12	12	13	12	13				
Margem superior	8	8	8	9	9	9	9	9	10	10	10	10	11	12	12	machos
Margem inferior	11	12	10	11	13	12	9	10	11	12	13	14	13	11	11	

Fica demonstrado, pois, que o número de dentes do sulco das quelíceras varia dentro da mesma espécie. Não pode ser empregado, consequentemente, como caracter de valor específico, como foi feito por diversos autores!

A figura 17 apresenta a face apical, dorsal do artículo basal da quelícera do macho, dotado de 3 robustas apófises, das quais uma é bífida na ponta.

O exame de *filhotes* com idades diferentes concorre de alguma maneira para explicar a variação do número de dentes nas margens das quelíceras. As 2 fileiras de dentes se formam dos ápices para as bases, decrescendo suas dimensões de tal maneira que os dentículos mais novos mal podem ser apreciados, tal é a sua pequenês.

Espinulação nas pernas e nos palpos:

QUADRO VII

Fórmula dos espinhos nos 5 pares de extremidades				
	FÊMURES	PATELAS	TÍBIAS	METATARSOS
FÊMEAS:				
Palpos..........	0	0	0	1 + 2 + 4
Perna I.......	3 + 4 + 3 a 4	1	1 + 3	2 + 1
Perna II.......	3 + 4 + 2 a 3	1	1 + 3	2 + 1
Perna III.......	3	1	1 a 2	2 + 1
Perna IV.......	8	1 + 1	2 + 3 + 3	1 + 2 + 2
MACHOS:				
Palpos..........	0	0	0	0
Perna I.......	3 + 4 + 3 a 4	1 + 1	2 + 3 + 4	1 + 2 a 3
Perna II.......	3 + 4 + 2 a 3	1 + 1	1 + 2 + 3	1 + 1 + 1
Perna III.......	2 + 2	1 + 1	1 + 1 + 1	1 + 1 + 1
Perna IV.......	2 + 4 + 1	1	2 + 2 + 2	1 + 2 + 2

Quelíceras, vistas pelo lado dorsal, mais longas ainda que o comprimento do cefalotorax, em exemplares adultos; bem mais curtas nos jovens. Primeiro e terceiro par de fiandeiras do mesmo comprimento. O segundo par é bem menor, de côr amarela, quase contíguo às posteriores. Os artículos basais são mais longos e robustos que os 2 artículos terminais.

Em aranhas jovens os "ungula" das quelíceras não apresentam a forma e o aspecto característico de *Tetragnatha,* mas são de comprimento normal, sem curvas ou estrangulamentos. Êste fato tem grande importância para a correta especificação de exemplares dêste gênero, pois foram descritas algumas espécies de *Tetragnatha,* de dimensões pequenas, em que as "ungula" são justamente pequenas.

A figura 18 apresenta o bulbo copulador do macho.

A população de Trindade distingue-se da *Tetragnatha antillana* descrita por Simon de St. Vincent, nas Antilhas Pequenas pelos desenhos ornamentais no dorso do abdomen e pelas faixas do ventre. Além disto atribui Simon à sua espécie apenas 6-7 dentes inferiores e 8 a 9 superiores nas margens das quelíceras, o que já não ocorre com a população de Trindade, embora pertença certamente à esta espécie.

3. *Araneus labyrintheus* (Hentz 1847)

Material estudado:

67 fêmeas adultas;

22 machos adultos;
8 machos jovens e diversas fêmeas jovens.

Araneus labyrintheus é comum na Carolina do Norte, na Califórnia, em diversas regiões do México, na Guatemala, no Panamá, na Venezuela ao longo do Atlântico, em diversas ilhas das Antilhas, particularmente em Barbados e em St. Vincent.

A larga faixa amarela da porção anterior do lábio e das margens internas das lâminas maxilares, presente em todos os exemplares de Trindade, distingue esta população de *A. labyrintheus*, como foi descrita por Hentz, por Cambridge e outros. As espécies afins, *A. uncatus, A. spinipes, incrassatus* e outras, não tiveram suficiente caracterisação, ainda que possam fàcilmente ser diferenciadas da população trindadense.

Cefalotorax marron; região ocular amarela; lâminas maxilares, lábio e esterno cobertos de pêlos escuros, havendo, entretanto, uma larga faixa amarela que circunda a margem anterior do lábio, as margens internas das lâminas maxilares e que se extende no meio do esterno. Dorso do abdomen ou com 2 manchas lanceetadas, mais largas atrás, amarelas ou cinzentas ou as mesmas confluem em um "folium" lanceetado, que se pode extender quase até ao fim do abdomen ou então existem sòmente 4 a 6 manchas amarelas, redondas, sendo todo o resto e os lados reticulados de manchinhas claras com orlas escuras. Nenhum exemplar é exatamente como o outro. Ventre negro, com faixa longitudinal larga no meio, interrompida adiante das fiandeiras, com mais 2 estrias longitudinais amarelas, laterais. Palpos inteiramente amarelos, excepto o tarso que é marron. Face superior das pernas salpicado de manchinhas escuras, menos frequentes e nítidas nos machos. Metatarsos e tarsos amarelo escuros.

Olhos dispostos em 2 filas de 4; a 1.ª levemente recurva, a 2.ª procurva mais fortemente, passando uma reta, tangente à borda anterior dos M. P., tangendo a borda posterior dos L. P. Os 4 medianos formam um trapézio, mais largo na frente que atrás. M. A. distantes entre si 0,7 diâmetros e dos L. P. 3,5 diâmetros. Os M. P. são os maiores, seguidos pelos M. A.; os 4 laterais são cêrca de 2 vêzes menores. Sòmente os M. P. se localizam ainda no plano horizontal do cefalotorax. Todos os restantes se encontram no plano quase que vertical da fronte.

O *epígino* apresenta-se, quando visto verticalmente, como uma tampa, divergente em frente e com borda posterior arredondada, encobrindo quase totalmente as entradas vulvares. (Figura 19); visto de perfil, observa-se um processo cônico, curto, dirigido para baixo (figura 20).

Sulco ungueal das quelíceras com 3 dentes na margem inferior, dos quais 2 são maiores e com 5 a 6 dentes na margem oposta, dos quais apenas 1 ou 2 são maiores (figura 21).

Metatarsos e tarsos das 4 pernas com tufos de cerdas ralas, robustas. Os pêlos dos fêmures são marrons, os das patelas e tíbias amarelas e delicadas, havendo entre êles espinhos robustos e negros.

4. *Argyope trifasciata* (Forskal 1775)

Material estudado:

2 fêmeas adultas;

1 macho jovem;

algumas fêmeas adolescentes.

Trata-se de uma espécie das mais conhecidas, tropical e subtropical-cosmopolita, capturada nas Américas desde o Canadá até ao Chile e ao longo das costas do Atlântico.

A figura 22 apresenta o epígino, com as 2 entradas genitais redondas e a tampa externa em forma de "T" com os lados recurvos. O septo mediano não encobre as aberturas genitais.

5. *Sidusa festiva* (Peckh. 1896)

1 fêmea adulta; 1 macho filhote; 1 fêmea filhote.

Epígino com as duas entradas vulvares simples, sem mais outros ornamentos externos. Externo duas vêzes mais longo que largo, um pouco mais estreito atrás que na frente. Metatarsos 3 e 4 com 3 "corôas" de 6 espinhos basais, 6 mediais e 4 a 6 apicais. Metatarsos 1 e 2 com apenas 2 pares de espinhos.

Todo o resto confere com a espécie, descrita por Peckham.

Conclusão

O estudo detalhado de 3 espécies — *H. venatória, T. antillana* e *A. labyrintheus* — com grande número de exemplares de ambos os sexos e de filhotes, — não deixa dúvida de que as representantes em Trindade já estão dotadas de caracteres populacionais próprios, que as identificam perfeitamente, podendo-se considera-las como r a ç a s de Trindade.

H. venatória tendo conseguido vencer tôdas as condições ambientais, alargou seu habitat pelos vales, planos inclinados e nos próprios morros da ilha, mesmo os mais elevados. Deve ser bastante antiga já, pois observamos uma surprendente concordância, de exemplar para exemplar, de diversos fatores morfológicos, como os olhos e principalmente a espinulação dos palpos e dos 4 pares de pernas.

T. antillana continua restrita necessàriamente à presença da única fonte de água dôce em Trindade, de maneira que seu habitat é impressionantemente restrito. Apresenta constância na espinulação das extremidades. O número de dentes, entretanto, nas duas margens dos sulcos ungueais, varia bastante.

A. labyrintheus está presa pràticamente à única árvore, fàcilmente acessível, da praia. Seu habitat é, pois, por demais precário. Precário parece-nos também sua faculdade de poder adaptar-se as condições ambientais de Trindade.

Sidusa festiva e *Argyope trifasciata* ainda são bastante raras em Trindade.

As condições ecológicas, reinantes em Trindade, oferecem interessantes aspectos, que impressionam principalmente no tocante às espécies *T. antillana* e *A. labyrintheus*. As duas espécies continuam restritas, pelas condições ambientais adversas, a um micro-ambiente por demais precário, constituido para a primeira pelo único filete d'água dôce e para a segunda pela única árvore frondosa praiana.

Por nossas observações constatamos que mesmo neste ambiente, morrem diàriamente algumas dezenas ou mesmo centenas de exemplares, quando sobrevêm os bruscos e implacáveis vendavais, acompanhados de chuvas abruptas.

Mesmo assim verifica-se uma perfeita e completa *sociabilidade* entre todos os indivíduos de cada uma das duas espécies, vivendo pacìficamente, lado a lado, em teias parcialmente comuns, machos, fêmeas e todos os descendentes. Êste fato está em oposição com o que costuma ser verificado com as mesmas aranhas em terra firme, onde os filhotes costumam empreender longas viagens, para afastar-se do habitat dos pais.

Um segundo fato que chama a atenção de qualquer observador é constituido pela grande *fecundidade* das fêmeas. A "quota da mortalidade" pela precariedade do ambiente é galhardamente superada pela "quota da natalidade" significativamente mais elevada. Pode-se, pois, esperar, se não houver intervenção abrupta no habitat das duas espécies, que alguma vêz alguns de seus descendentes lograrão, ajudados por um vento favorável, a conquista dos topos dos altos morros, onde há regiões abrigadas dos ventos, bastante vegetação, humus e alimento suficiente também, além de uma poça de água dôce parada.

Êste lance significativo para a sobrevivência já foi conseguido por *Heteropoda venatória*.

A fauna aracnológica de Trindade, da qual capturamos e estudamos 5 espécies, entre as quais três com tôda a minúcia, constitui palpitante assunto — bastante raro também — a permitir, de um lado, uma aferição minuciosa dos fatores realmente importantes na micro-evolução das espécies e sua subespeciação, e do outro, a mostrar o ingente esfôrço pela sobrevivência do ser vivo em condições ecológicas não favoráveis de todo.

A primeira garantia desta sobrevivência, lado a lado, é encontrada nas próprias aranhas: As 5 espécies, que conseguiram sobreviver em Trindade, pertencem a 3 famílias diferentes e a 5 gêneros diversos. Não foram encontradas espécies afins, do mesmo gênero, que necessàriamente teriam mais ou menos os mesmos costumes e, por conseguinte, seriam "concorrentes" biológicas. Pelo contrário, hábitos de vida diversos — diversidade de alimento, micro-habitat próprio à cada uma — tornam as 5 espécies aptas a uma cohabitação pacífica, não atrapalhando nenhuma à sua vizinha.

A segunda garantia é a adaptação fisiológica às condições ambientais. Esta adaptação já se cristalizou genèticamente em *Heteropoda venatória* e está a concretizar-se em *T. antillana* e *A. labyrintheus,* pelas quais também será certamente conseguida, se não houver mudança brusca em seu pequeno habitat, ocasionada por novas avalanches ou pela mão do homem, que atualmente se encontra em Trindade.

As 5 espécies de aranhas devem ser consideradas "extremamente uteis" no ambiente de Trindade. Alimentando-se exclusivamente de insetos vivos, obtidos ou por caça ativa — *Heteropoda* e *Sidusa* — ou por meio de teias, onde ficam presos — *Tetragnatha, Araneus* e *Argyope* — constituem estas aranhas uma espécie de "polícia sanitária" na ilha, merecendo, por isto, a proteção do homem. De mais a mais são elas completamente inofensivas ao mesmo, não constituindo pois, sua presença, perigo algum.

Resumo

Em uma expedição científica à ilha de Trindade, situada no Oceano Atlântico, à altura de Vitória, Espírito Santo, a cêrca de 1.200 km desta costa, em companhia da primeira tropa de ocupação da ilha por ocasião da colaboração brasileira no Ano Geofísico internacional de 1957/58, percorreu uma equipe de cientistas do INSTITUTO BUTANTAN aquela ilha, tanto pelas praias, como pelas encostas e os altos morros.

Foram encontradas 5 espécies de aranhas verdadeiras: *Heteropoda venatória, Sidusa festiva, Tetragnatha antillana, Araneus labyrintheus* e *Argyope trifasciata.*

Destas 5 espécies foram estudados com minúcia, à mão de abundante material, *H. venatória, T. antillana* e *A. labyrintheus,* tanto em seu ambiente natural na ilha, no seu habitat, costumes de vida e adaptação às condições ecológicas como em seus detalhes morfológicos. Os resultados encontrados mostram que as três espécies estão desenvolvendo caracteres de *sub-especiação,* bastante apreciáveis e constantes já em *H. venatória,* flutuantes ainda, em escala maior ou menor, em *T. antillana* e *A. labyrintheus.*

Concomitantemente ao estudo da fauna aracnológica, dedicamos a nossa atenção também às condições ecológicas gerais de ilha.

Impõem-se a retirada ou o estabulamento dos porcos, carneiros e cabritos. Consideramos muito interessante que os centros, que lidam com êstes animais, se entendam com a marinha, para obter a retirada de alguns lotes de porcos, cabritos e carneiros, para estudos genéticos e melhoria das raças do sub-continente. Quando de volta de Trindade, ainda a bordo do "Barroso Pereira", fizemos um minucioso relatório ao Capitão daquele navio, para ser entregue às altas autoridades da Marinha de Guerra do Brasil, em que expusemos os nossos pontos de vista, sôbre o destino de Trindade e que, em resumo, foram os seguintes:

a) Retirada dos porcos, carneiros e cabritos ou seu estabulamento;
b) Trazer "humus" da terra firme e promover um reflorestamento, também por árvores frutíferas, das regiões praianas, das encostas, ainda relativamente isentas de erosão e protegidas dos ventos;
c) Trazer alguns animais, que poderiam ser benéficos na ilha, por darem caça aos gafanhotos e às chusmas de moscas, como lagartixas, sapos, rãs, etc..
d) Proteger as aranhas existentes, as tartarugas e trazer minhocas juntamente com o humus.
e) Construir um cais, o que seria relativamente fácil e pouco dispendioso, quando feito no mesmo local, em que desembarcamos, isto é, na "ampulheta", denominada do João Alberto, distante cêrca de 150 metros ao sudeste da Casa Grande, ao lado de um promontório mar a dentro, formado por pedras sólidas. Bastaria trazer alguns grandes blocos de pedras, abundantes na praia e despenca-los nos vãos destas rochas, unindo tudo com cimento e estaria feito um dique, a garantir um desembarque enxuto em qualquer tempo. Ainda seria preciso dinamitarem-se algumas pedras na imediações, que ficam submersas na zona da ressaca.

Zusammenfassung

Die ökologischen Bedingungen und die arachnologische Fauna der brasilianischen Vulkaninsel TRINDADE, die auf der Höhe der Küstenstadt Vitória, in Espírito Santo, 1.200 km im atlantischen Ozean liegt, werden dargelegt.

Trindade ist eine einsame, unbewohnte Felsinsel von etwas über 20 Quadratkilometer Grösse, bei 6 km Längs-und 4 km breitester Querachse. Etwa die Hälfte seiner äusseren Kontouren wird von fast lotrecht ins Meer abfallenden Felsen gebildet, ist also von Wasser aus kaum zu erreichen. Die andere, flachere, Hälfte besteht zwar aus flachen schmalen Strandstreifen, die vom Schiffe aus gesehen, weissgelblich in der Sonne liegen, aber auch sie sind mit keinem Boote zu erreichen, da sich gerade an diesen Stellen ausgedehnte

Korallenbänke unter Wasser gegen die Insel vorschieben und diese Bänke in der Brandungszone eine gewaltige Stufe aufweisen, so dass, selbst bei relativ ruhigem Meere, sich hohe Wogen erheben und überstürzen und gewaltig gegen das Land anrollen.

Das Zentralbergmassiv von Trindade wird durch gewaltige, oben mehr oder weniger abgerundete Bergkegel von etwa 500 bis 600 Meter Höhe gebildet. Davor schieben sich etwas niederigere Felsen. oft von schroffen gebirgsartigen Vulkancharakter und noch weiter davor liegen viele, zum Himmel ragende Monolithen, bis rund 300 Meter Höhe, bald lotrecht, bald leicht geneigt, und geben Trindade sein besonderes vulkanisches Aussehen.

An den Abhängen und wenigen unwirtlichen Plateaus liegen riesige Haufen von Schutt, Geröll, Steinblöcken, Vulkanasche, die von oben kamen. Die gesamte Insel unterliegt zur Zeit den Prozessen der lebhaftesten Verwitterung. Ungeheuer heftiger Wind, scharfe Regenschauer, jäher Temperaturwechsel von tropischer Hitze zu kalten Nächten, bilden, im gigantischem Zusammenspiel, die vernichtenden Erosionskräfte, die allmählich die Berge, Felsen und Abhänge abtragen und in die Abgründe befördern.

Die *Flora* kann sich heute etwa nur mehr auf dem sechsten Teil der Insel mehr oder weniger behaupten. Alles andere sind nackte, zu tiefst zerklüftete, in lebhafter Verwitterung begriffene Felsen ehemaliger eruptiver Vulkankräfte. Einige Meter über dem Meere, in der Gegend der milderen Gestade, findet sich hauptsächlich kurzes spärliches Steppengras und die *Waltheria americana*. Auf den besteigbaren, sandigen Anhöhen, findet man hin und wieder spärliche Farnkräuter, mit zum Teil schon losen Wurzeln. Auf etwa 400 Meter Höhe, in einem relativ windgeschütztem Plateau, ist wiesenartiges kurzes Gras vorhanden und schliesslich auf den höchsten Höhen mit flachem Bergrücken steht unerwartet ein schattiger Wald von einigen hundert Quadratmetern, von drei Baumarten gebildet, die jedoch nicht frei in den Himmel wachsen können, sondern deren Kronen von der ungeheueren Windstärke "wie mit einer Scheere" oben, in Windrichtung, abrasiert sind. Als Unterwald bestehen hier oben mehre Farnsträucher. Teilweise sind die Bäume von Epiphyten überwuchert. Als gänzlich unerwartete "Sehenswürdigkeit" Trindades liegt oben bei 550 Meter Höhe ein Urwald von Baumfarnen der Art, *Cyathea copelandi*. Einzelne Stämme erreichen die beträchtliche Höhe von 7 Meter mit einem Stammumfang von 20 bis 30 Zentimetern. Beim Anblick dieses Farnwaldes vermeint man, in die Urzeiten der Erde versetzt worden zu sein.

Das Meer um Trindade ist besonders reich an Fischen, die Korallenuntergrund lieben, Krabben, Hummern, Seeigeln, Seesternen, Muscheln u. s. w. Unter den Korallenlöchern em Strande haust eine bissige Muräne. Wir sichteten und fingen eine Art Libelle, eine Art Tagfalter, mehrere Nachfalterarten,

viele Arten von Insekten, zwei Periplaneta, Ameisen, Grillen, die Wanderheuschrecke, *Schistocerca paranensis* und manche andere, kleinere und primitivere Insektenart. Die gemeine Stubenfliege, *Musca domestica* ist in Schwärmen auf ganz Trindade, bis auf die höchsten Bergspitzen hinauf, vertreten, und bildet neben der die Vegetation vernichtenden Wanderheuschrecke die grösste Plage.

Das Erstaunlichste der Insel Trindade ist das Vorhandensein von Herden von Schafen, Ziegen und Schweinen. Europäische Seefahrer, wie der berühmte Astronom Halley, der Trindade um 1700 anlief, die Seekapitäne, Dupensel — 1760 auf Trindade —, Jakob Cook, 1775 auf der Insel, D'Auvergne, 1782 in Trindade und viele andere, setzten hier Pärchen dieser Tiere aus. Seither haben sich diese sehr vermehrt und wir konnten mehrere hundert Stück von Ziegen und Schafen zählen, die in kleineren Herden zusammenlaufen und tiefe Pfade ausgetreten haben. Die Schweine sind seltener. Sie erfuhren eine biologische Regression und besonders die alten Männchen ähneln in ihrem Aussehen ganz den europäischen Wildschweinen.

In diesem Punkte stimmt Trindade also mit den Osterinselm und mit manchen anderen Ozeaninseln, wo ebenfalls ähnliche Tiere ausgesetzt wurden, überein. Heute sind diese Tiere auf den einsamen Felsinseln nicht blos überflüssig, sondern sogar sehr schädlich, vernichten sie doch das bischen Vegetation, das auf solchen Inseln das kärgliche Leben erkämpft.

Ausserdem trafen wir einige Katzen, *felis ochreata domestica* und *Mus musculus,* die sich wohl noch nicht lange auf Trindade befinden mögen.

Trindade ist auch eine der wenigen Inseln, an deren Strand die grosse Meeresschildkröte zur Eiablage schreitet. Wir zählten über 50 grosse Trichter im Sande, in deren Tiefe die vielen Eier verscharrt wurden. Die Schweine und die verschiedenen Arten von Fregattenvögeln auf Trindade sind die Todfeinde sowohl der Eier wie der auskriechenden jungen Schildkröten, die eilig dem Meere zuzustreben pflegen. Dort warten gierige Raubfische und dezimieren den Rest.

Unser hauptsächlichstes Augenmerk lenkten wir jedoch auf die Spinnen, von denen wir folgende Arten antrafen und fingen:

Fam.	*HETEROPODIDAE*	— *Heteropoda venatória* (L. 1767)	— 114	exemplares;
"	*ARGYOPIDAE*	— *Tetragnatha antillana* Sim. 1897	— 55	"
"	"	— *Araneus labyrintheus* (Hentz 1847)	— 106	"
"	"	— *Argyope trifasciata* (Forsk. 1775)	— 5	"
"	*SALTICIDAE*	— *Sidusa festiva* (Peckh. 1896)	— 5	"

Von diesen 5 Arten haben wir besonders die 3 ersteren gründlich untersucht, sowohl auf Trindade in Bezug auf ihre Ökologie, wie auch in Butantan, in Bezug auf vergleichend morphologische Eigenheiten.

Das Studium dieser an sich kleinen und für den Nichtfachmann relativ unbedeutenden Spinnenfauna gestattete uns einen staunenswerten Einblick in die biologischen Eigenheiten dieser Arthropoden in Bezug auf die zum mindesten ablehnenden Umweltfaktoren dieser unwirtlichen Insel.

Als 1. Begebenheit fanden wir, dass sich keine dieser 5 Arten auch nur im geringsten gegenseitig im "Wege" steht, so dass unter ihnen kein Kampf oder Bruderzwist um "das tägliche Brot" besteht. *Sidusa* und *Heteropoda* sind Raubspinnen, die frei umherjagen und ihre Beute mit ihren Giftzangen erlegen; *Tetragnatha, Argyope und Araneus* sind sedentäre Radnetzspinnen, die ihre Beute mit Hilfe des Gespinstes überwältigen. Die artlichen Unterschiede im Beutefang gehen aber noch weiter: *Sidusa* jagt nur tagsüber; *Heteropoda* nur nachtsüber; *Tetragnatha* hat ihre Netze über dem einzigen Süsswasserrinnsal der Insel gespannt; *Araneus* haust etwa 2 bis 4 Meter über dem Boden, auf dem einzigen Dattelbaum der Insel und bewohnt dort oben ihre Netze, auf angewehte Beute harrend und *Argyope* zieht ihre Gespinste flach über dem Boden dahin.

Auch die Lebensgewohnheiten dieser 5 Arten sind vollständig andere: *Heteropoda* bewohnt Halzbalken, haust unter den Dächern, zwischen Brettern, Mauerresten und auf freier Insel sowie oben auf den Bergesspitzen obligatorisch unter den vielen flachen, losen Steinen. Meisterhaft versteht sie da die Wärme der Sonne auszunützen; je nach dem Sonnenstande ist sie morgens auf der rechten, nachmittags auf der linken Seite der Steinfläche, so dass sie immer die volle Wärme empfängt. Bald erlernten wir ihre Tricks und es war für uns eine abgemachte Tatsache, auf welcher Steinunterseite wir zur gegebenen Tageszeit zu suchen hatten. Interessanter Weise bevorzugen diese Spinnen diejenigen Steine, deren Untergrund auch schon einen "gedeckten Tisch" für sie aufweist. Fast immer fanden wir eine oder zwei oder sogar drei *H. venatória* in den Mulden eng an die Steinunterseite angeschmiegt und im Boden darunter zwei Arten von *Periplaneta,* eine Art Grille und eine kleine schwarze Ameisenspezies, ausser vielen Isopoden.

Sidusa festiva spaziert in kleinen Sprüngen auf den Steinen und blanken Balken herum und lauert auf die Fliegen, die sie leicht im Sprunge erhascht. *Argyope trifasciata* gaukelt den Schmetterlingen ein trügerisches Bild einer Blume vor, bis diese sich verhängnisvoll nähern und an ihrem Bondennetze haften. *Tetragnatha antillana* hat sich vollständig auf Wasser liebende Insekten spezialisiert und *Araneus labyrintheus* schliesslich erhascht ihre Beute, die durch das Aufsuchen der Früchte ihres Baumes durch die Windstösse gegen ihre Netze getrieben werden.

Haben sich nun einerseits alle diese Spinnenarten ein friedliches Nebeneinander garantiert ohne gegenseitige Beeinträchtigung beim Nahrungserwerb,

so sind sie doch andererseits noch keineswegs vollständige Meisterinnen der feindlichen Umwelt geworden. Vielleicht kann *H. venatória* ausgenommen werden; denn diese konnte sich tatsächlich schon auf Trindade ausbreiten, vom Strande bis auf die höchsten Höhen klimmen und sich überall ungeheuer vermehren, besonders da sie auf der Insel scheinbar keinen einzigen Feind hat.

T. antillana dagegen hat es noch nicht fertig gebracht, sich von den etlichen hundert Quadratmetern der Süsswassergräben in der Nähe des Meeres zu entfernen. Hier ist ihr obligatorisches biologisches Habitat. Hier spannen die vielen hunderten von Exemplaren ihre Netze in vollem Bewusstsein der Gegenseitigkeit. Oft werden dieselben Rahmenfäden von mehreren Nachbarinnen benützt. Wenn auch die eigentlichen Netze streng individuell bleiben, klettern doch die Männchen und die Jungen über die Behausungen der Nachbarinnen, rasten auch einmal da, ohne dass ihnen von der Besitzerin Gafahr drohe.

Trotz dieses weitgehenden Sozialismus als Lebenserleichterung scheint aber diese Art immer noch von dem Mikroklima abzuhängen, das durch die Gegenwart des Süsswassers, erzeugt wird. Nirgendwo auf der Insel fenden wir dieselbe Art. Sollte einmal dieses Wasser versiegen oder vom Menschen umgeleitet oder in Röhren gelegt werden, wird wohl auch das Schicksal von *T. antillana* mit besiegelt sein.

Noch tragischer mutet einen der Biotop von *A. labyrintheus* an, der exklusiv auf den einzigen alten Dattelbaum in Strandnähe beschränkt verblieben ist. Naht ein Sturm mit Regenschauern, werden die Netze zerrissen, so lassen sich die Spinnlein auf Fäden behende zu Boden fallen, bleiben vorerst einige Sekunden reglos liegen; werden dann plötzlich wieder lebendig und verkriechen sich unter Laub und Steinen. Viele gehen dabei zu Grunde. Die Überlebenden kehren später wieder zu ihrer verhängnisvollen Behausung zurück.

Diese 2. wichtige Begebenheit — der Kampf gegen die feindlichen Umweltfaktoren, gegen die auszuweichen es praktisch keine Möglichkeit auf Trindade gibt — hat uns besonders beeindruckt. Der Wille zum Überleben hat auch seinen biologischen, morphologischen — und wahrscheinlich auch genetischen — Ausdruck erfahren. *H. venatória,* von der wir viele Weibchen, Mänchen, adolescente weibliche und männliche Formen untersuchten und einige ihrer Merkmale vergleichend morphologisch prüften, ist schon zum Range einer eigenen Population aufgestiegen. Ja man ist versucht, an Hand der verblüffenden spiegelbildartigen Übereinstimmungen besonders der Augen, der Zähne an der Ober — und Unterseite des Quelizerenfalzes und vor allem der Bedornung der Palpen und der vier Laufbeinpaare, anzunehmen, dass alle hunderte und tausende von Exemplaren dieser Population von einem einzigen Urelternpaare abstammen müssten.

Trindade war in dieser Beziehung für uns ein grosses biologisches Erlebnis, zeigte sie uns doch deutlich Darwins Evolution der Umwelt bedingten Rassen, und wie die gewandtere Art nicht bloss überlebt, sondern sogar neue Biotopen aufsuchen kann.

Bei *antillana* und *labyrintheus* sind auch subspezifische morphologisch bemerkbare Evolutionen unverkenntlich. Aber diese befinden sich noch auf der Stufe höchster Variation, ohne Auskrystalisation bester biologischer Merkmale. Parallel mit diesem sind beide auch noch nicht über ihren winzigen Anfangsbiotop hinausgekommen und ihr Überleben hängt weiterhin von der Gegenwart des Süsswässerleins und des Dattelbaumes ab.

Als 3. Begebenheit konnten wir festestellen, dass trotz allem, sowohl der grosse Biotop der *H. venatória* wie auch die beiden Mikrobiotope von *T. antillana* und *A. labyrintheus* voll und gut ausgenutzt und biologisch verwertet werden. Unendlich gross ist die Natalitätsquote dieser drei Arten, entschieden grösser als auf dem Festlande und geeignet, die Mortalitätsziffern bei weitem zu überflügeln.

Die beiden Radnetzspinnen zeigten überall zwei und drei sogar 4 Eisäcke. Wir sammelten einige und zählten die Eier und Embryonen, die in die vielen Hunderte gingen. Dasselbe ist mit *H. venatória* der Fall, wenn auch hier jedes Weibchen nur je eine Oothek unter seinem Sternum führte. Das Mindeste waren 163 und das Höchste 507 befruchtete Eier .

Allen Anschein nach dürften die drei Arten, nachdem die selektiven Naturkräfte auf sie eingewirkt haben und sie selber genetisch befähigt waren, sich ihnen sowohl anzupassen als auch die ungünstigen zu überwinden, auf Trindade weiter bestehen. *Antillana* und *A. labyrintheus* müssen allerdings noch einen grossen Kampf gegen die Naturgewalten um die Ausbreitung ihres allzuengen Biotops bestehen, was innerhalb der Grenzen der Möglichkeit liegt, da wir auch oben auf den Bergen sehr günstige Lebensbedingungen vorgefunden haben, sowie auch einen kleinen klaren Bergsee.

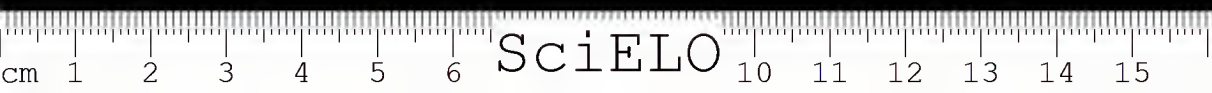
Wenn man bedenkt, dass die durchschnittliche Lebensdauer einer *Argyope* etwa 1 ein halb bis 1 dreiviertel und die der *H. venatória* etwa 3 Jahre beträgt und man andererseits bedenkt, dass sich diese Spinnen, die mit den früheren Seegelschiffen von den Antillen her eingeschleppt wurden, schon etwa über 100 Jahre oder noch länger auf Trindade befinden, so kann man ermessen, wie viele Generationen nötig sind, damit eine Mikroevolution einer Art im Sinne einer Lokalrasse von statten gehe. Kein einziger, sprunghaft verschiedener, Mutant wurde aufgefunden.

Explicação dos desenhos:

Figura	1:	*Heteropoda venatória*	— diversas fases evolutivas do epígino;
"	2:	" "	— configuração dos olhos;
"	3:	" "	— espinulação do sulco ungueal;
"	4:	" "	— lábio e lâminas maxilares;
"	5:	" "	— espinhos no femur dos palpos;
"	6:	" "	— " na patela;
"	7:	" "	— " na tíbia;
"	8:	" "	— " no tarso;
"	9:	" "	— denteação da garra de uma perna;
"	10:	" "	— femur do palpo do macho;
"	11:	" "	— bulbo copulador em repouso;
"	12:	" "	— bulbo copulador "extraído";
"	13:	" "	— bulbo copulador-total.
"	14:	*Tetragnatha antillana*	— denteação do sulco ungueal; fêmea
"	15:	" "	— denteação-vista de cima;
"	16:	" "	— denteação no macho;
"	17:	" "	— apófises apicais no artículo basal da quelícera
"	18:	" "	— bulbo copulador;
"	19:	*Araneus labyrintheus*	— epígino, visto de cima;
"	20:	" "	— " , visto de perfil;
"	21:	" "	— denteação do sulco ungueal;
"	22:	*Argyope trifasciata*	— epígino.

Trabalho entregue para publicação em 18/8/59.

Foto 1: Vista total da ilha de Trindade. À esquerda o "Paredão" e o "Pão de Assucar".

Fôto 2: Vista sôbre a "Crista de Galo", Trindade.

Foto 3: Região do nosso desembarque, onde pode ser construído um cais.

Foto 4: Uma cinta de pedras roliças fêz sossobrar um barco.

Foto 5: A Casa Grande, construída em 1916, ao lado da qual corre o filete de água doce, potável.

Foto 6: Alojamento da tropa na praia dos Portuguêses.

Foto 7: Descanço dos técnicos do Butantan durante uma das ascenções aos picos mais elevados.

Foto 8: Aspecto da vegetação nos altos morros.

Foto 9: Vista do "Morro do Desejado".

a)
b)
c)
d)
Fig 1
a)
b)
c)
Fig 2
Fig 3
Fig. 4
Fig. 5
Fig. 6
Fig. 7
Fig. 8
Fig. 9
Fig. 10
Fig. 11
Fig. 12

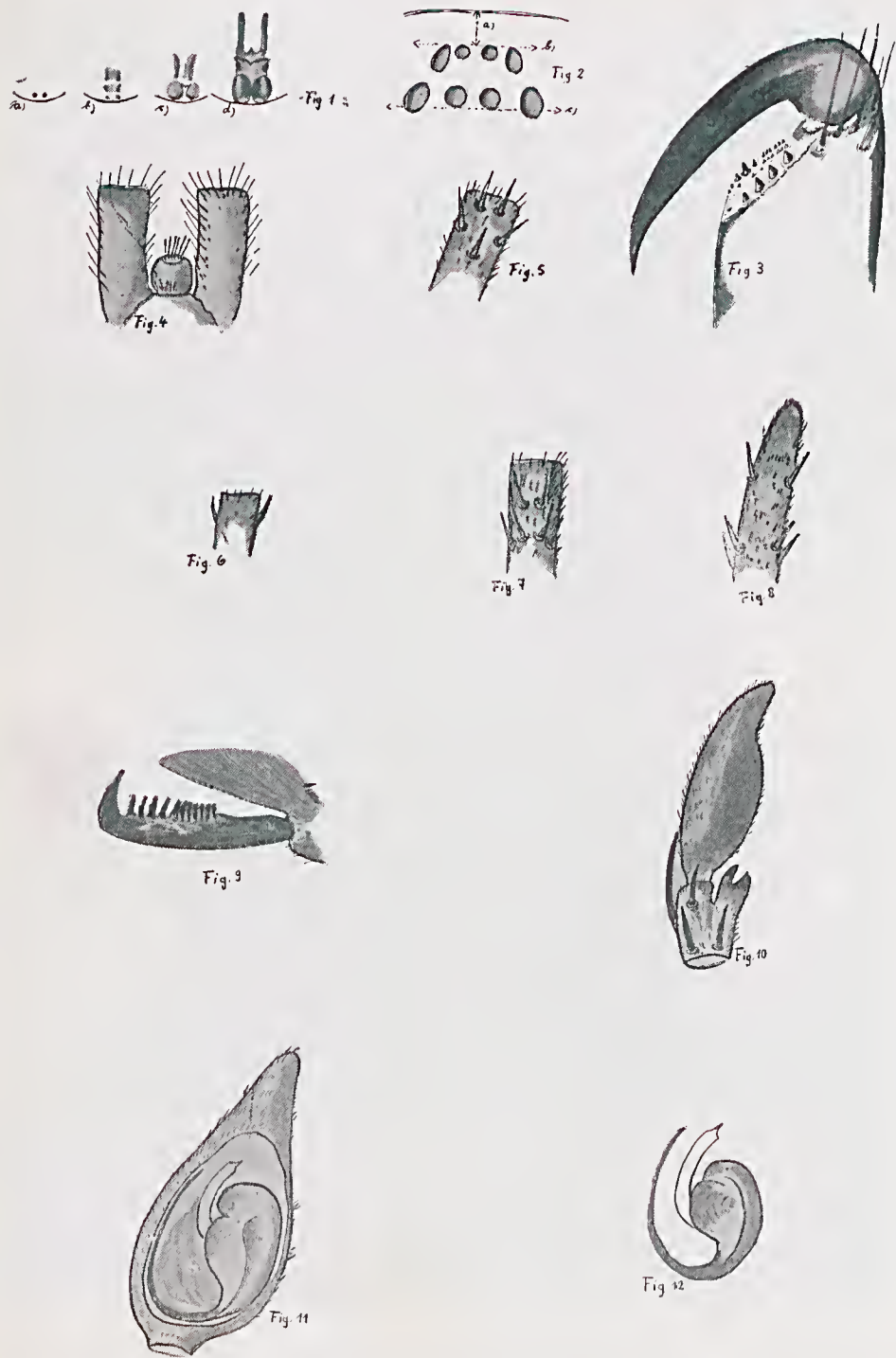



Fig 13

Fig. 14

Fig 15

Fig. 16

Fig. 17

Fig. 18

Fig 19

Fig 20

Fig 21

Fig. 22

ÍNDICE